



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA  
FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA

**NUEVAS ACCIONES DE P53:  
HOMEOSTASIS METABÓLICA Y EFECTO OREXIGÉNICO DE  
GHRELIN**

DOUGLAS ALFREDO VELASQUEZ RAIMUNDO

MEMORIA para optar al grado de Doctor

Universidad de Santiago de Compostela, 2012





UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA

Dr. Carlos Diéguez González, catedrático de Fisiología de la Universidad de Santiago de Compostela

Dr. Rubén Nogueiras Pozo, Investigador “Ramón y cajal”, departamento de Fisiología, Universidad de Santiago de Compostela

Certifican que:

La presente Tesis Doctoral titulada “**Nuevas acciones de p53: Homeostasis metabólica y efecto orexigénico de ghrelin**”, elaborada por Douglas Alfredo Velásquez Raimundo, ha sido realizada bajo nuestra dirección en los Laboratorios de Neurociencia “Ramón Domínguez” del Departamento de Fisiología de la Universidad de Santiago de Compostela, estimando que se encuentra concluida y en condiciones de ser presentada para optar al grado de Doctor.

Y para que conste firmamos la presente autorización en Santiago de Compostela, Mayo de 2012

Fdo.: Carlos Diéguez González  
Pozo

Fdo.: Rubén Nogueiras



INDICE

INTRODUCCION .....	3
I. Obesidad .....	3
II. Hipotálamo.....	5
Núcleo Arcuato .....	5
Núcleo paraventricular .....	6
Núcleo ventromedial hipotalámico.....	7
Núcleo dorsomedial hipotalámico .....	8
Área hipotalámica lateral.....	8
III. Péptidos hipotalámicos y periféricos que estimulan la ingesta	9
Neuropéptido Y .....	10
Péptido relacionado a agouti.....	12
Hormona concentradora de melanina .....	15
Ghrelin .....	17
IV. Péptidos hipotalámicos y periféricos que inhiben la ingesta.	27
Transcripto regulado por cocaína y anfetaminas .....	27
Melanocortinas .....	28
Leptina .....	31
Colecistocinina .....	37

## INDICE

Polipéptido YY/ polipéptido P.....	39
V. Señales intracelulares	
AMPK.....	43
Sirtuinas .....	49
P53 .....	55
OBJETIVOS .....	67
MATERIALES Y METODOS .....	71
I. Animales de experimentación .....	73
II. Técnicas experimentales .....	76
III. Metodología Experimental.....	77
IV. Protocolo experimental .....	79
V. Metodología analítica.....	81
RESULTADOS.....	103
Efecto de la dieta estándar en ratones p53 knockout .....	105
Efecto de la dieta alta en grasas en ratones p53 knockout .....	110
Efecto del estado nutricional sobre niveles de SIRT y p53 en hipotálamo de ratas Sprague-Dawley.....	129
Efectos de ghrelin sobre ingesta y niveles de proteína en hipotálamo de ratas Sprague-Dawley.....	131
Efecto del bloqueo farmacológico de SIRT1 sobre la acción orexigenica de ghrelin.....	133

Efecto del bloqueo de SIRT1 sobre la acción de ghrelin en el metabolismo de ácidos grasos a nivel del hipotálamo. ....	135
Efecto del bloqueo de SIRT1 sobre la acción de ghrelin en la expresión de factores de transcripción y neuropéptidos mediadores de la ingesta. ....	136
Efectos de ghrelin sobre la ingesta y el metabolismo de ácidos grasos en ratones p53 KO .....	138
Efecto de la administración de Resveratrol sobre la ingesta y el metabolismo de ácidos grasos a nivel del hipotálamo de ratones p53 ko. ....	141
Efectos de la administración de AICAR sobre la ingesta y el metabolismo de ácidos grasos en ratones p53 ko .....	144
DISCUSION .....	147
CONCLUSIONES .....	163
BIBLIOGRAFIA .....	167





## TABLA DE ABREVIATURAS

<b>ACC:</b> acetil-CoA carboxilasa	<b>GLP1R:</b> receptor de GLP-1
<b>ACTH:</b> hormona adrenocorticotropina	<b>GLUT:</b> transportador de glucosa
<b>AgRP:</b> proteína relacionada con agouti	<b>GOAT:</b> ghrelin <i>O</i> -aciltransferasa
<b>AICAR:</b> 5-aminoimidazol 4 carboxamida ribosido	<b>GTT:</b> test de tolerancia a glucosa
<b>AMPK:</b> adenosin monofosfato activado por kinasa	<b>HFD:</b> dieta alta en grasa
<b>ARC:</b> núcleo arcuato hipotalámico	<b>i.c.v.:</b> intracerebroventricular
<b>ARNm:</b> ácido ribonucleico mensajero	<b>IMC:</b> índice de masa corporal
<b>ATM:</b> Ataxia Telangiectasia Mutated	<b>ITT:</b> test de tolerancia a insulina
<b>BAT:</b> tejido adiposo marrón	<b>JAK2:</b> Kinasa Janus 2
<b>BHE:</b> barrera hematoencefálica	<b>LHA:</b> hipotálamo lateral
<b>CART:</b> transcrito regulado por anfetamina y cocaína	<b>LKBI:</b> liver kinase B1
<b>CCK:</b> colecistocinina	<b>LMW:</b> bajo peso molecular
<b>CPT-1:</b> carnitina-palmitoil transferasa	<b>LPL:</b> lipoprotein lipasa
<b>CRH:</b> hormona liberadora de corticotropina.	<b>MBOAT:</b> acyltransferasas unidas a membrana
<b>DMH:</b> núcleo dorsomedial hipotalámico	<b>MCD:</b> malonyl-CoA decarboxilasa
<b>FAS:</b> ácido graso sintasa	<b>MCH:</b> hormona concentradora de melanina
<b>FFA:</b> ácidos grasos libres	<b>MCR:</b> receptor de melanocortinas (MCR-3, MCR -4)
<b>GABA:</b> ácido gammaaminobutírico	<b>MDM2:</b> (Murine Doble Minute 2
<b>GH:</b> hormona del crecimiento	<b>MMC:</b> complejo mayor de migración
<b>GHRH:</b> hormona liberadora de la hormona de crecimiento	<b>mTOR:</b> “mammalian target of rapamycin”
<b>GHS:</b> secretagogos de GH	<b>NAc:</b> núcleo acumbens
<b>GHS-R:</b> receptor de secretagogos de GH (GHS-R1a y GHS-R1b)	<b>NF-<math>\kappa</math>B:</b> factor nuclear kappa-beta
<b>GLP-1:</b> péptido tipo glucagon	<b>NPY:</b> neuropéptido y
	<b>NTS:</b> núcleo del tracto solitario
	<b>OB:</b> leptina
	<b>Ob:</b> obesos

**ObR:** receptor de leptina

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa

**PEPCK:** fosfoenolpiruvato carboxikinasa

**PKC:** proteína kinasa c

**PLC:** fosfolipasa c

**POMC:** proopiomelanocortina

**PPAR:** receptor activado por el proliferador de peroxisomas

**PVN:** núcleo paraventricular hipotalámico

**SCO2:** citocromo c oxidasa 2

**Sir2:** silent information regulator 2 protein

**SNC:** sistema nervioso central

**SNS:** sistema nervioso simpático

**SOCS 3:** supresor de la señalización de citokinas

**SREBP:** proteína de unión a elementos regulados por esterol

**STAT3:** transductor de señal y activador de la señal 3

**TAG:** triglicéridos

**TNF $\alpha$ :** factor de necrosis tumoral  $\alpha$

**TRH:** hormona liberadora de tirotropina

**TSH:** hormona estimuladora del tiroides

**UCP:** proteína desacoplante

**VMH:** núcleo ventromedial hipotalámico

**WAT:** tejido adiposo blanco

**Y-R:** receptor de NPY (Y1R, Y2R, Y3R, Y4R, Y5R, Y6R))

**$\alpha$ -MSH:** hormona estimuladora de melanocitos

## INTRODUCCIÓN



## I.-OBESIDAD.

La obesidad representa un estado de exceso de almacenamiento de grasa corporal. Similarmente, el sobrepeso es definido como un exceso en el peso corporal comparado con la talla. Por lo que es de mucha utilidad el uso del índice de masa corporal para clasificar los diferentes grados de obesidad. El índice de masa corporal, aceptado por la Organización Mundial para la Salud (OMS) resulta de la división del peso expresado en kilogramos, entre la estatura, expresado en metros al cuadrado. ( $IMC = \text{peso (kg)} / \text{estatura (m}^2\text{)}$ ). Con esta clasificación, el sobrepeso se puede definir a aquellas personas con un  $IMC = 25\text{-}29.9 \text{ kg/m}^2$ , Obesidad  $IMC = 30\text{-}39.9 \text{ kg/m}^2$ , Obesidad mórbida  $IMC \geq 40 \text{ kg/m}^2$ . (Martínez JA., 2004).

Por otra parte, se sabe que la forma primaria en la cual la energía potencial es almacenada en nuestro organismo, es en forma de grasa (triacilglicéridos). La densidad calórica y la naturaleza hidrofóbica de los triacilglicerolos permiten el almacenamiento energético y eficiente sin consecuencias osmóticas adversas. La primera ley de la termodinámica, la cual establece que la cantidad de la energía almacenada es igual a la diferencia entre la ingesta energética y la energía consumida, es uniformemente aplicable a nuestro organismo. La cantidad de triacilglicéridos en el tejido adiposo es la suma acumulativa a lo largo del tiempo entre las diferencias entre la ingesta de energía (alimentos) y el gasto energético (el cual es representado por el metabolismo basal, la actividad física y la termogénesis).

Aunque teóricamente los mecanismos homeostáticos mantienen esta diferencia cercana al equilibrio, pequeñas alteraciones de este balance a lo largo del tiempo pueden tener un efecto acumulativo de grasa a nivel del tejido adiposo.

El apetito incluye varios aspectos de patrones de alimentación como frecuencia y tamaño de episodios de comida, alimentos altos en grasa o bajo

## INTRODUCCION

en grasa, la densidad de los alimentos consumidos, sabor agradable de las comidas, y la variabilidad de la ingesta de cada día, lo que al final nos lleva a una conducta propia de alimentación. Esta conducta de nuestra alimentación es controlada por una serie de señales a corto plazo que pueden ser hormonales, psicológicas y neuronales que pueden provenir del tracto gastrointestinal, o señales a largo plazo que provienen de diferentes tejidos como el tejido adiposo o el páncreas (ver tabla 1). Todas estas señales actúan en diversos sitios del sistema nervioso central (SNC), el cual contiene una gran cantidad de péptidos y neurotransmisores que influyen y determinan nuestra conducta alimenticia.

Neuropéptidos	Orexigénicos	anorexigénicos
<b>Centrales</b>	Neuropeptido Y (NPY)	-Transcripto relacionado a cocaína y anfetaminas (CART)
	Hormona concentradora de melanina (MCH)	-Melanocortinas (POMC)
	Orexinas/hipocretinas	-Peptidos similares a glucagón
	Péptido relacionado a Agouti (AgRP)	-Insulina
	Galanina	-Serotonina
	Opiodes endógenos	-Neurotensina
	Endocannabinoides	
<b>Periféricos</b>	Ghrelin	-Péptido YY
		-Colecistocinina (CCK)
		-Leptina
		-Amilina
		-Insulina
		-Péptido similares a glucagón
		-Bombesina

**Tabla N° 1:** Algunos de los factores orexigénicos (estimulan la ingesta) y anorexigénicos (inhiben la ingesta) centrales y periféricos que influyen en la ingesta de alimentos

## II.-HIPOTALAMO

El hipotálamo ha sido reconocido como una región central en la regulación de la alimentación. Los sistemas homeostáticos que influyen en la ingesta de alimentos comprenden sistemas reguladores hormonales del hambre, saciedad y niveles de adiposidad, tales como leptina, ghrelin e insulina (ver más adelante) los cuales actúan en el hipotálamo y en circuitos cerebrales para estimular o inhibir la ingesta de alimentos y mantener así los niveles apropiados del balance energético. El papel del hipotálamo ha sido revelado por experimentos clásicos, describiendo algunos núcleos como centros de la saciedad y centros del hambre.

El hipotálamo está constituido por diferentes núcleos que están interconectados entre sí, expresando cada área diferentes neuropéptidos con diversas acciones sobre la regulación del balance energético. Dentro de las principales regiones del hipotálamo involucradas en la ingesta de alimentos o saciedad encontramos:

### *Núcleo Arcuato (ARC):*

Se encuentra cercano al tercer ventrículo y por encima de la eminencia media. Esta área del núcleo arcuato-eminencia media es un área en donde la barrera hematoencefálica se encuentra modificada, permitiendo la entrada de péptidos periféricos y proteínas. (Schwartz et al, 1992). El ARC contiene grupos de neuronas que expresan el neuropéptido Y (NPY) y el péptido relacionado a Agouti (AgRP), que son péptidos que aumentan la ingesta (orexigénicos) y contiene también al precursor de melanocortinas pro-opiomelanocortinas (POMC) y transcrito relacionado con cocaína-anfetamina (CART), los cuales son péptidos anorexigénicos. Los axones de estas neuronas se proyectan a neuronas de segundo orden, localizadas en el

## INTRODUCCION

núcleo paraventricular (PVN) donde las hormonas anorexigénicas, hormona liberadora de tirotropina (TRH) y hormona liberadora de corticotropina (CRH) y oxitocina son secretadas, y otra parte de las neuronas del ARC se proyectan al área hipotalámica lateral (LHA) y área perifornical (PFA) donde las orexinas y la hormona concentradora de melanina (MCH) son producidas. Cuando las señales de adiposidad (insulina y leptina) alcanzan al ARC, los péptidos anorexigénicos son liberados y activan a circuitos catabólicos. Al contrario la activación de vías anabólicas lleva a la liberación de péptidos orexigénicos y ocurre cuando las señales de adiposidad que llegan al cerebro son bajas, indicando la necesidad de restablecer los almacenamientos de energía. Todas estas características le permiten al ARC integrar señales hormonales para la homeostasis energética.

### *Núcleo paraventricular (PVN)*

Se encuentra adyacente a la parte superior del tercer ventrículo en el hipotálamo anterior. El PVN es el principal sitio de liberación de CRH y TRH. Numerosas vías neuronales implicadas en el balance energético convergen en el PVN, incluyendo proyecciones de neuronas NPY del ARC, orexinas, derivados del péptido POMC y el péptido estimulante del apetito galanina. Todo esto, hace que el PVN desempeñe un papel importante en la integración de señales nutricionales con la glándula tiroides y el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (Neary et al., 2004).

El PVN es muy sensible a la administración de péptidos implicados en la ingesta como colecistocinina (CCK), NPY ó ghrelin. Estos péptidos pueden actuar mediante la proteína kinasa sensible a AMP (AMPK). Estas proyecciones desde otros núcleos, así como la de los péptidos periféricos,



pueden regular la actividad de las neuronas TRH y las que expresan CRH, y éstas a su vez actúan sobre las células hipofisarias productoras de TSH, indicando así que el PVN integra señales nutricionales con el eje hipofisario y tiroideo.

### *Núcleo ventromedial hipotalámico (VMH)*

Es ampliamente conocido como el centro de la saciedad. Ha sido identificado como un sitio diana de la leptina, la cual actúa en el hipotálamo inhibiendo la ingesta de alimentos, estimulando el gasto energético y por lo tanto causando la pérdida de peso. Las lesiones en este núcleo producen hiperfagia y obesidad.

El VMH puede aumentar directamente la actividad de las neuronas POMC mediante microcircuitos, estimulando su actividad excepto en estado de ayuno en el que disminuye, además de proyectar hacia otros núcleos hipotalámicos y al tronco cerebral. Por su parte el ARC también regula la actividad del VMH donde se encuentran receptores tipo 4 de las melanocortinas (MCR4), y receptores para el neuropéptido Y tipo Y1R, Y2R e Y5R, sugiriendo que tanto POMC como NPY emiten proyecciones al VMH. La importancia del VMH en la regulación de la homeostasis energética ha sido demostrada por estudios en los que se demuestra la existencia de receptores de leptina (ObRb) y activación neuronal inducida por leptina: inyecciones selectivas de leptina en el VMH reducen la ingesta y el peso corporal en ratas (Irani BG, 2008).

## INTRODUCCION

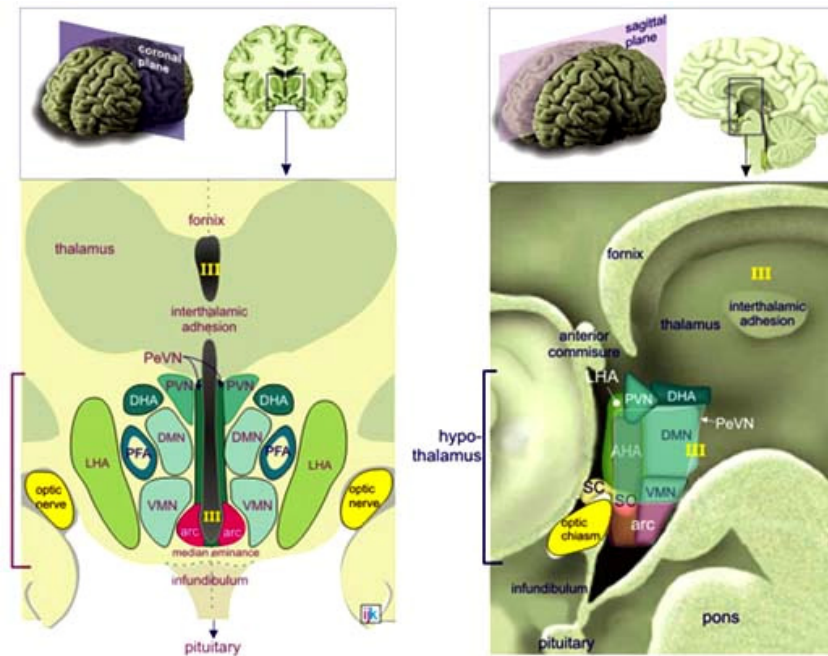
### *Núcleo dorsomedial hipotalámico (DMH)*

Este núcleo tiene extensas conexiones con otros núcleos hipotalámicos mediales y laterales y sirve como integrador y procesador de información de esos núcleos. El núcleo DMH está relacionado con la modulación de la secreción de glucocorticoides, temperatura corporal, sueño-vigilia, ritmo circadiano y actividad locomotora (Elmqvist JK, 1998; Gooley JJ, 2006).

### *Área hipotalámica lateral (LHA)*

Es el clásico centro del hambre, contiene neuronas sensibles a la glucosa que son estimuladas por la hipoglicemia y es crucial en mediar la marcada hiperfagia inducida por la disminución de la glucemia (Bernardis and Bellinger, 1996).

En él se sintetizan dos tipos de péptidos: hipocretinas (orexinas) y MCH. Se caracterizan por emitir proyecciones a un amplio número de zonas del SNC (córtex, tálamo o sistema límbico) participando en numerosas funciones tales como aprendizaje, memoria, emoción, y respuestas motoras en función del estado energético ya que están reguladas por numerosas hormonas, entre ellas, ghrelin y leptina.



**Fig 1:** representación esquemática del hipotálamo, su ubicación en el cerebro y sus principales núcleos: Núcleo arcuato (ARC), núcleo paraventricular (PVN), Núcleo ventromedial (VMN), Área hipotalámica lateral (LHA), Núcleo Dorsomedial (DMN), Área perifornical (PFA).

### III.-PÉPTIDOS HIPOTALÁMICOS Y PERIFÉRICOS QUE ESTIMULAN LA INGESTA (orexigénicos)

#### ***Neuropéptido Y***

El Neuropéptido Y (NPY), aislado en 1982, contiene 36 residuos de aminoácidos, incluyendo un residuo de tirosina en cada extremo, es uno de los más abundantes péptidos del hipotálamo y uno de los más potentes factores orexigénicos, ha sido funcionalmente implicado en el comportamiento alimenticio, regulación cardiovascular, control del eje neuroendocrino y retención de la memoria. El ARC es el sitio de mayor expresión para NPY dentro de las neuronas del hipotálamo que se proyectan al PVH, DMH, área lateral del hipotálamo y área perifornical y otros sitios hipotalámicos.

Cinco receptores de NPY han sido identificados Y1, Y2, Y4, Y5, Y6, los cuales median sus acciones en el hipotálamo. El receptor Y5 ha sido implicado como un importante receptor que media los efectos de la ingesta de NPY. El Y5 se expresa relativamente en grandes niveles en el LHA, cercano al sitio donde NPY actúa potentemente para estimular la ingesta. Una de las principales funciones que se le han atribuido a las neuronas de NPY del ARC, es el restaurar el balance energético normal y las reservas de grasa corporal bajo condiciones de déficit energético. Al contrario, la obesidad inducida por sobrealimentación voluntaria, no es acompañada por incrementos en la actividad de las neuronas de NPY en el ARC (Widdowson *et al.*, 1997).

Las neuronas que sintetizan NPY en el ARC son altamente sensibles al estado de deficiencia de energía y altas demandas metabólicas. Su expresión es estimulada por la privación de comida, así como estados de

incrementos de ejercicios, frío y embarazo. Se ha visto una elevada expresión de NPY durante la administración de esteroides como la corticosterona, la cual se libera en estados de balance energético negativo. Similarmente a la corticosterona, ghrelin, el ligando endógeno del receptor de secretagogos de la hormona de crecimiento (GHSR), es un indicador de insuficiencia energética que afecta a la expresión de NPY. Una demostración de la relación entre ghrelin y NPY es que esta hormona estimula la ingesta de alimentos más marcadamente cuando es inyectada directamente al ARC e induce la expresión de *c-Fos* (un marcador de activación neuronal) predominantemente en neuronas NPY del ARC, donde el ARNm de GHSR es expresado (Guan XM et al, 1997). También se ha demostrado una relación entre NPY e insulina y leptina, ya que ambas reducen la expresión génica de NPY (Abe M. et al, 1991). Este efecto parece estar mediado por receptores de leptina e insulina en las neuronas de NPY. Además de estas relaciones, hay evidencias de que ciertos nutrientes pueden afectar la expresión de péptidos involucrados en la conducta alimenticia. Estas evidencias sugieren que NPY se encuentra estrechamente relacionado con la glucosa y su metabolismo, así como los carbohidratos de la dieta (Jeanrenaud B, 2001; Shor-Posner G, 1991). Esta relación entre NPY y carbohidratos sugiere que este péptido puede estar relacionado con señales que reflejan una deficiencia de la disponibilidad de glucosa, su almacenamiento o utilización. Esta afirmación es apoyada por evidencias que demuestran que los niveles de ARNm de NPY en el ARC son significativamente elevados después del bloqueo farmacológico de la utilización de glucosa con 2-desoxy-D-glucosa. (2-DG) (Akabayashi A, et al 1993; Sergeev VG, et al, 200).

La expresión de NPY es marcadamente afectada por la administración aguda de glucosa, mostrando una relación inversa con los niveles circulantes.

## INTRODUCCION

Dentro de los primeros 30-60 minutos después de la inyección de glucosa, NPY es inicialmente suprimido en relación a los niveles ascendentes de glucosa, después de 90 minutos, este efecto es revertido, llevando a la estimulación de NPY según como lo niveles de glucosa se acercan a su línea basal. Un mecanismo que puede mediar estos cambios, es la glucocinasa, un sensor de la utilización de glucosa, que se expresa en neuronas NPY del ARC (Lynch RM, 2000). También se ha visto que la administración de NPY produce un incremento en el cociente respiratorio, lo cual refleja una reducida utilización de las grasas a favor de los carbohidratos, incrementando así la acumulación de grasa corporal (Menendez JA, 1990).

En conclusión se puede afirmar que las neuronas de NPY en el ARC están estimuladas bajo condiciones de balance energético negativo, como ocurre después de la privación de alimentos, en una dieta baja en calorías, antes del inicio del ciclo normal de alimentación o en animales destetados con poca grasa corporal. La función de NPY endógeno durante la escasez de alimentos o en estado de bajo almacenamiento de carbohidratos es promover la ingesta de alimentos, reducir la oxidación de grasas a favor de los carbohidratos o estimular la lipogénesis de novo.

### ***Péptido relacionado a Agouti (AgRP)***

El AgRP es un péptido de 132 residuos de aminoácidos, tiene una alta homología al producto del gen del color agouti en ratones (una molécula de señal paracrina producida normalmente en la piel que inhibe el efecto de la hormona  $\alpha$  estimulante de los melanocitos, sobre los receptores MC-1 (Leibel et al., 1997). AgRP es expresado primariamente en el ARC, en neuronas que también producen NPY. El AgRP suprime la actividad basal del MCR-4 (receptor tipo 4 de melanocortinas). Estudios

inmunohistoquímicos muestran que los cuerpos celulares de AgRP se encuentran limitados al ARC, fibras de AgRP se proyectan a diversas áreas del cerebro y múltiples áreas dentro del hipotálamo, incluyendo al PVN y área lateral y perifornical del hipotálamo (Haskell-Luevano et al., 1999). Otros estudios demuestran una relación funcional estrecha entre los circuitos neuronales de AgRP y NPY (Mizumo TM, 1999). Se ha demostrado que estados de balance energético negativo o incremento en la demanda de energía, como privación de comida o durante la lactancia, los cuales reducen los niveles de leptina e insulina e incrementan los niveles de ghrelin y de corticosterona, estimulan AgRP junto con NPY (Chen P., et al., 1999). Al igual que NPY, AgRP es suprimido bajo condiciones de balance energético positivo, cuando la leptina y los niveles de insulina se encuentran elevados y los niveles de ghrelin se encuentran disminuidos. La expresión de AgRP es alta en ratas con dietas bajas en calorías comparadas con dietas ricas en grasas. Al igual que NPY, AgRP se incrementa en condiciones donde la utilización de glucosa es reducida, como la inyección de 2-DG (Sergeyev V, 2000). Esto es apoyado por estudios en los cuales los niveles endógenos de AgRP son suprimidos por una única inyección de glucosa, mientras este efecto es revertido cuando los niveles de glucosa caen a sus límites basales. Al igual que NPY, la administración central de AgRP tiene un potente efecto estimulador de la ingesta de alimentos. Este efecto estimulador de AgRP dura hasta 6 días, un efecto más duradero que el observado con NPY (Hagan MM, 2000). La administración crónica de AgRP, al igual que NPY, también incrementa la ingesta de comida diaria y disminuye el consumo de oxígeno y la capacidad del tejido adiposo marrón para consumir energía, llevando a un incremento de la ganancia de grasa corporal y los niveles de leptina (Small CJ, 2001). Tanto AgRP como NPY, median los efectos de ghrelin. Los ratones con sobreexpresión de *Agrp*

## INTRODUCCION

tienen un fenotipo similar al de NPY, ya que muestran hiperfagia y obesidad, incremento de la longitud corporal, hiperinsulinemia, hiperplasia de los islotes pancreáticos e hiperglicemia de inicio tardío (Graham M, 1997). Sin embargo los ratones con deficiencia de *Agrp*, son normofágicos y muestran un peso y composición corporal normal bajo una alimentación *ad libitum* (Qian S, 2002). Otros estudios demuestran un antagonismo entre los sistemas de AgRP/NPY y el sistema de melanocortinas (péptidos anorexigénicos) en controlar la ingesta y el peso corporal. Estudios electrofisiológicos sugieren que las neuronas AgRP interactúan con las neuronas de POMC en el ARC a través del GABA (ácido gamma aminobutírico, neurotransmisor inhibitorio) (Cowley MA, 2001). Los axones de neuronas AgRP/NPY colocalizan con proyecciones de GABA hacia células POMC en el ARC e inhiben su actividad neural, apoyando la idea de que AgRP/NPY producen efectos anabólicos suprimiendo el sistema de las melanocortinas (POMC). Por otra parte se ha visto que la leptina inhibe la activación de las neuronas AgRP/NPY y reduce la liberación de GABA hacia las neuronas POMC (Cowley MA, 2001). Contrariamente ghrelin estimula las neuronas AgRP/NPY, induciendo un incremento de la liberación de GABA e inhibiendo las neuronas POMC (Cowley MA, 2003). En conclusión se puede afirmar que el funcionamiento de AgRP en el ARC es similar a NPY en relación a su modo de activación por condiciones de deficiencia energética. Este perfil endocrino es evidente en sujetos al inicio de una fase activa, posterior a una privación de alimentos, en estado de baja consumo de glucosa o en dietas bajas en calorías, bajo esas condiciones AgRP estimula la ingesta, reduce la utilización de lípidos a favor de los carbohidratos, y promueve la síntesis de lípidos.



***Hormona concentradora de melanina (MCH)***

Es un neuropéptido orexigénico cíclico de 19 aminoácidos. Se deriva de su precursor prepro-MCH, del cual se derivan también otros péptidos con funciones todavía desconocidas (Lieberman et al., 2006). Los cuerpos celulares de las neuronas que contienen MCH se encuentran principalmente en hipotálamo lateral y en la zona incerta que como hemos descrito son centros reguladores de la alimentación. Mientras MCH es similar a NPY y AgRP en ser estimulado por la privación de alimentos e inhibido por leptina, difiere en los anteriores en que no es afectado por la administración de ghrelin o insulina. También se ha visto que la expresión de MCH permanece inalterada en ratas obesas inducidas por dieta comparadas con ratas delgadas. Este péptido actúa específicamente a través del receptor tipo 1 (MCHR1) el cual es un receptor con siete dominios transmembranal asociado a proteínas G. EL receptor MCHR1 se expresa ampliamente en el ARC, LHA y en VMH, y también en áreas extra hipotalámicas (Hervieu GJ, 2000; Saito Y, 1999). La expresión de MCH es estimulada por el ayuno. El papel de MCH en el control de la ingesta y homeostasis energética es apoyado por hallazgos de la administración central de este péptido que potencian la ingesta (Kawano H, et al., 2002). Aunque este efecto inducido por MCH es relativamente corto y de pequeña duración comparado con el de NPY. Existe evidencia de que MCH puede tener un mayor efecto en procesos metabólicos que pueden contribuir a la ganancia de peso (Qu D, et al., 1996). Esto fue demostrado por el bloqueo de la expresión de MCH en ratas expuestas al frío, en las cuales se vio un efecto débil sobre la ingesta, pero causó una pérdida de peso corporal junto con un incremento de la expresión de la proteína desacoplante tipo 1 (UCP1) (Pereira-da-silva M, 2003).

## INTRODUCCION

La infusión crónica de MCH o agonistas de MCH producen hiperfagia, junto con incremento de la eficiencia calórica, ganancia de peso, actividad lipogénica y aumento de la grasa corporal. Se ha observado que la administración de MCH en ratones produce un fenotipo de obesidad hiperfágica en dietas altas en grasas en asociación con una disminución de la temperatura corporal y reducción de la oxidación de ácidos grasos y termogénesis en el tejido adiposo marrón (Gomori A, et al, 2003). Contrariamente, la administración de un antagonista de MCH-R1 produce una disminución en el peso corporal y el gasto energético. La delección del gen MCH produce un fenotipo delgado, asociado con hipofagia y un incremento en la tasa metabólica. De manera similar los ratones carentes del receptor tipo 1 de MCH ganan menos peso que los controles durante una dieta alta en grasas debido a un incremento en la tasa metabólica y en la termogénesis que es secundario a un incremento a la actividad locomotora (Chen Y, et al, 2002; March DJ, 2002). Hay evidencias que demuestran que MCH tiene funciones específicas en la señalización de NPY. Se han demostrado conexiones recíprocas entre fibras que contienen NPY y fibras de MCH dentro del ARC y el área lateral hipotalámica y se ha visto que la administración crónica de MCH activa a la expresión del ARNm de NPY en el ARC (Broberger C, et al., 1998). También se ha visto una relación entre el sistema de las melanocortinas y MCH, ya que neuronas que contienen MCH en el área hipotalámica lateral y perifornical reciben proyecciones de las neuronas de melanocortinas en el ARC y la producción de MCH se encuentra sometido a la inhibición tónica de las melanocortinas (Elias CF, 1998).

## GHELIN

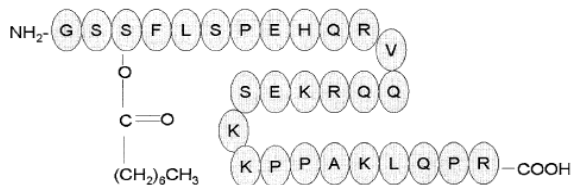
### Antecedentes y estructura

El descubrimiento de ghrelin tuvo sus raíces en la búsqueda de ligandos de secretagogos del receptor de la hormona del crecimiento (GHS-R) (Kojima et al., 1999). La caracterización en 1982 de la hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH) llevó a enfocarse en la búsqueda de las interacciones entre GHRH y somatostatina, y se llegó a aceptar que la secreción de la GH era el resultado del balance entre el efecto estimulador e inhibitorio de esos 2 péptidos hipotalámicos. Sin embargo Bowers y cols demostraron que una serie de péptidos sintéticos (llamados de forma genérica GHS (growth hormone secretagogues) de los cuáles el más conocido era el GHRP-6) eran incluso más potentes que el propio GHRH en la inducción de la secreción de GH. Esto hizo postular la existencia de receptores específicos para estos péptidos (Momany FA, et al., 1981).

El descubrimiento del receptor para estos péptidos (GHS-R) fue realizado por Smith et al., 1996 y resultó ser un clásico receptor acoplado a la proteína G, conteniendo 7  $\alpha$  hélices transmembranales y 3 asas intra y extracelulares. La búsqueda de ligandos endógenos para este receptor se inició posteriormente y la identificación inicial fue por Kojima et al, que utilizaron la estrategia del “receptor huérfano” para descubrir el ligando, construyendo una línea celular que expresaba GHS-R y monitorizando cambios de la concentración intracelular de calcio en tejidos de rata como cerebro, pulmón, corazón, riñón, intestino y estómago (Hagemann et al., 2003; Kojima et al., 1999; Arvat et al., 2001). Sorprendentemente, la máxima actividad fue encontrada en el estómago, del cual fue purificado un péptido de 28 residuos de aminoácidos, este péptido fue nombrado Ghrelin, de *ghre*, palabra con orígenes proto-indo-europea que significa “crecimiento”. Posteriormente los

## INTRODUCCION

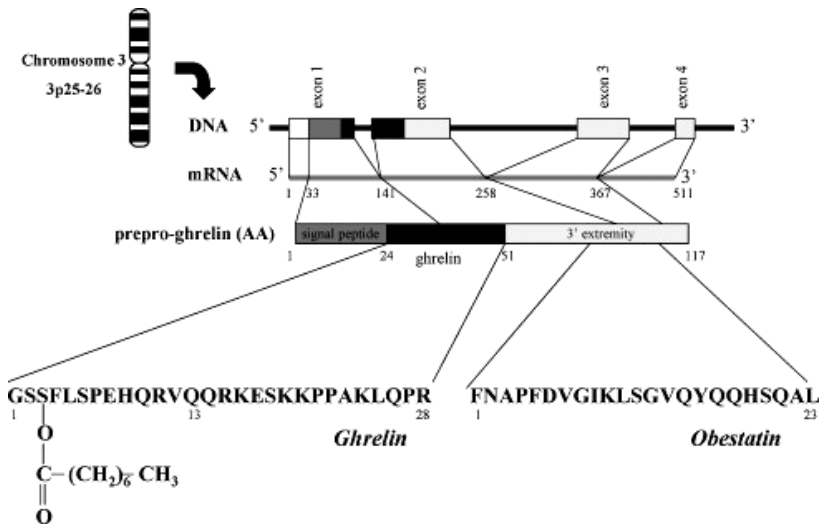
análisis mostraron que la forma activa de ghrelin se encontraba acilada en la serina 3, por un ácido n-octanoico, esta modificación es única para ghrelin y es requerida para su actividad biológica y en 1999, Kojima et al., llegaron a mostrar que ghrelin estimulaba la secreción de GH in vitro y en vivo.



**Fig. 2:** Estructura de ghrelin humano acilado en la serina 3 por un ácido n-octanoico.

### *Ghrelin-Síntesis y regulación*

Ghrelin es primariamente sintetizado como una pre-pro hormona consistente en 117 residuos de aminoácidos. El procesamiento posterior de preproghrelin resulta en dos moléculas maduras una forma de 28 residuos de aminoácidos u otra forma de 27 residuos de aminoácidos (Figura 3). Las secuencias de ghrelin en ratas y ratones son idénticas y difieren del ghrelin humano por solo dos residuos de aminoácidos, la sustitución de la arginina 11 y la valina 12 sustituidas por la lisina 11 y la alanina 12. En un proceso transcripcional, el tercer residuo, una serina, es acilado con n-octanoico o n-decanoico, por la acción de la enzima O-aciltransferasa (GOAT) del que sus máximas concentraciones se encuentran en páncreas y estómago en humanos, y en estómago e intestino en ratones, y a nivel intracelular se piensa que se encuentra localizada en el retículo endoplasmático (Hosoda H, 2003; Sakata I, 2009; Yang J, 2008).



**Fig. 3:** Estructura del gen de ghrelin humano, transcripción y traducción hasta procesos post-transcripcionales que llevan a la síntesis de formas aciladas de ghrelin así como la síntesis de obestatina.

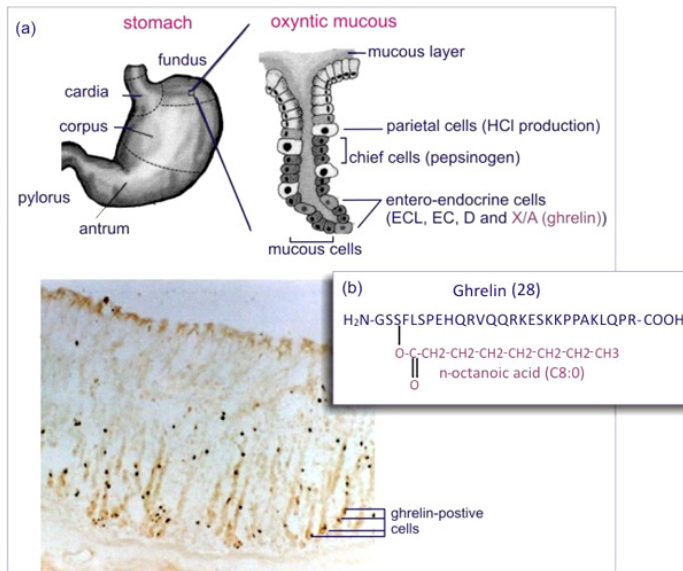
La mayoría del ghrelin circulante es sintetizado y secretado por células tipo A del estómago de las células oxínticas de la mucosa del fundus gástrico. La mucosa oxíntica es rica en células endócrinas, las cuales se encuentran distribuidas en tres tipos: células enterocromafines (65-70%), células tipo A (20-25%) y células conteniendo somatostatina (10-15%) (Date Y, 2000; Domonville de la Cour C, 2001). El ARNm de ghrelin es altamente expresado en el estómago cuando se compara con otros tejidos, aún más los niveles plasmáticos de ghrelin disminuyen hasta un 75% después de una gastrectomía (Ariyasu H, 2001). La segunda mayor fuente de síntesis y secreción de ghrelin se encuentra en el intestino delgado y en menores cantidades también se encuentra en la hipófisis anterior, células pancreáticas, pulmón, riñón, linfocitos, placenta, testículos e hipotálamo y corteza cerebral (Korbonits M, 2001). Las máximas concentraciones de su receptor (GHS-R1a) han sido encontradas en la hipófisis y en el hipotálamo. En el cerebro la

## INTRODUCCION

expresión de ghrelin se ha encontrado mayoritariamente en neuronas en el hipotálamo, adyacente al ARC, VMH, DMH y PVH con proyecciones superpuestas al núcleo supraquiasmático. El receptor GHSR-1a se expresa también en vías aferentes vagales y vías aferentes espinales viscerales, células inmunes, tiroides, páncreas, bazo, miocardio, ovario y tejido adrenales (Harrold JA., 2008; Howard AD, 1996; McKee KK, 1997).

Datos farmacocinéticos de ghrelin acilado muestran un patrón similar al de ghrelin total, cuya vida media se encuentra entre 10 y 30 minutos en la circulación sanguínea. Se ha estimado que cerca del 20% del ghrelin total es acilado, mientras la secuencia del extremo carboxilo terminal no es necesaria para algunas de sus acciones. El grupo n-octanoil es esencial para la unión al GHS-R1a y su activación (Kojima M, 2005).

Los niveles totales de ghrelin en plasma se incrementan preprandialmente y disminuyen post-prandialmente, demostrando una relación de ghrelin y la conducta alimentaria de los individuos. Otro aspecto relacionado con los niveles de ghrelin es la composición de los macronutrientes, siendo los carbohidratos, proteínas y grasas, factores que suprimen la secreción de ghrelin. La secreción de ghrelin disminuye solo después que los nutrientes dejan el estómago y son absorbidos a la circulación. Los niveles plasmáticos de ghrelin también son disminuidos por somatostatina e incrementados por agonistas colinérgicos (Beck B, 2002; Bowen J., 2006; Foster-Schubert K. E., 2008).



**Fig. 4:** (a) Representación esquemática del fundus del estómago y de la mucosa oxíntica, las cuales son la fuente más importante de ghrelin (b) estructura de acil-ghrelin.

### Ghrelin-Mecanismo de acción

El acil-ghrelin humano cruza la barrera hematoencefálica por un sistema de transporte saturable en ambas direcciones con una mayor tasa en humanos que en ratón. La máxima permeabilidad de ghrelin en humanos podría estar relacionada con las diferencias en las secuencias de aminoácidos en la cadena polipeptídica comparado con el ghrelin de ratón. El transporte de ghrelin a través de la barrera hematoencefálica es promovido por niveles máximos de triacilglicéridos y ayuno y disminuidos por la obesidad (Banks WA, 2002; Banks WA, 2008). Tal y como se ha descrito el ghrelin ejerce la mayoría de sus acciones a través del GHSR-1a, un receptor acoplado a proteínas G (Howard AD, 1996).

## INTRODUCCION

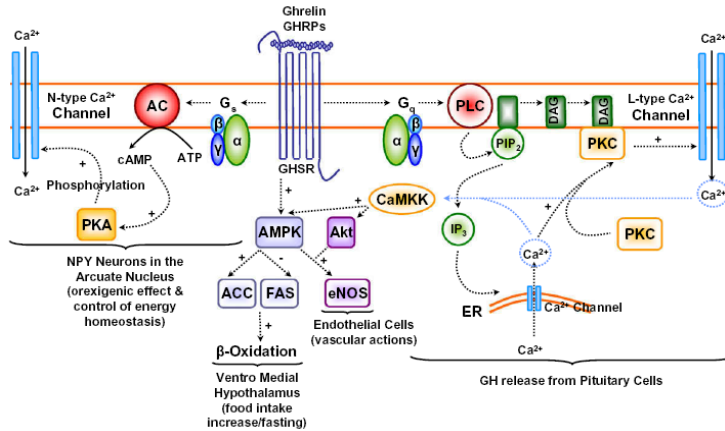
La expresión de AGRP/NPY en el ARC es esencial para el control de la alimentación y el peso corporal y diversos estudios han demostrado que la activación de las neuronas NPY y AGRP en el hipotálamo medio basal media los efectos de ghrelin en el balance energético (Gropp E., 2005; Luquet S. et al., 2005).

Periféricamente se cree que la acción adipogénica de ghrelin puede ser directa y puede estar mediada por la regulación de PPAR- $\gamma$ , aunque otros estudios demuestran que ghrelin media la adiposidad periférica a través de los receptores de melanocortinas en el hipotálamo y el sistema nervioso simpático eferente, efecto que es independiente de la ingesta (Barazzoni R., 2005).

Otro aspecto importante en el mecanismo de acción de ghrelin es su sistema de señalización intracelular y dentro de este el calcio desempeña un papel importante en el modo de señalización utilizado por los receptores GSHR-1a. El ghrelin incrementa los niveles de calcio a través de la adenilato ciclasa cinasa A y es capaz de desencadenar la liberación de GH a través de la proteína cinasa fosfolipasa C (ver figura 5) (Kohno D, 2003; Chen C, 1996).

Se conoce también que ghrelin incrementa la ingesta de alimentos en relación al ayuno a través de la activación de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK) y acetil-CoA carboxilasa (ACC) y la inhibición de la sintasa de ácidos grasos (FAS) en el VMN. También existen datos que respaldan que el metabolismo de ácidos grasos, la activación de AMPK y especies de oxígeno reactivas, pueden mediar las acciones de ghrelin en el núcleo ARC y VMN (López M, 2008; Andrews Z. B., 2008).





**Fig. 5:** Mecanismo de acción de ghrelina, a través de receptores GHS-1<sup>a</sup> en el hipotálamo e hipófisis. Ghrelina incrementa el ion calcio intracelular a través de la vía de la proteína cinasa adenilato ciclasa (AC-PKA) en las células que expresan NPY en el núcleo arcuato o a través de la fosfolipasa C (PLC-PKC). AMPK junto con acil-CoA carboxilasa (ACC) y la ácido graso sintasa (FAS) también median el incremento de la ingesta de alimentos mediado por ghrelina durante un ayuno.

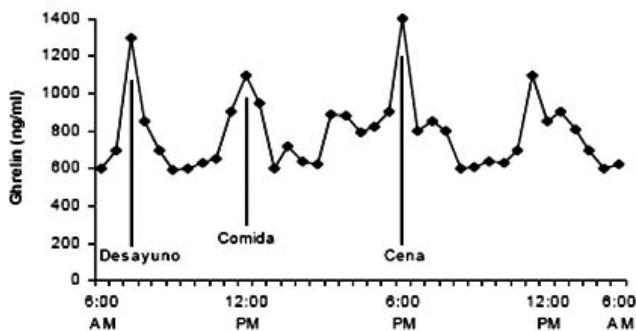
### Ghrelina-Balance energético y ghrelina

Existen muchas evidencias que demuestran que el ghrelina es importante en la regulación del apetito y del balance energético a corto y largo plazo. Existe un aumento preprandial de ghrelina y una caída postprandial en el plasma apoyando la hipótesis que ghrelina actúa como un iniciador del consumo de comidas en humanos (ver figura 6) (Cummings DE, 2004; Callahan HS, 2004, McCowen KC, 2002).

Ghrelina se describe también como la contraparte de la insulina y la leptina. Ghrelina también reduce la secreción de insulina estimulada por la glucosa, por lo tanto ghrelina incrementa los niveles sanguíneos de glucosa y altera la tolerancia de glucosa. También se ha demostrado que ghrelina incrementa los niveles de ARNm de la proteína 1 de unión al elemento regulador de

## INTRODUCCION

esteroles (SREBP1) así como proteínas relacionada con el almacenamiento de grasa, incluyendo a ACC, FAS y lipoproteína lipasa (LPL) llevando a la estimulación de la acumulación de lípidos intracitoplasmáticos, disminuyendo así el uso de grasa como combustible metabólico y favoreciendo un incremento de la adiposidad y del peso corporal. Ghrelin induce la obesidad abdominal, independientemente de su actividad orexigénica central (Thompson NM, 2004; Zhang W, 2004).



**Fig. 6:** Representación de los niveles plasmáticos de ghrelin durante un período de 24 horas, se observan picos de ghrelin previos a las comidas y disminuyen posterior a estos.

De esta forma los niveles de ghrelin se correlacionan inversamente con el IMC. Por lo tanto los niveles de ghrelin están reducidos en aquellos sujetos que son obesos comparados a los sujetos normales (Tschöp et al., 2001; Williams et al., 2006). Los niveles de ghrelin se correlacionan negativamente con factores que aumentan la obesidad, porcentaje de grasa, insulina y niveles de leptina. En adición, la pérdida de peso se encuentra asociada con un incremento de los niveles plasmáticos de ghrelin (Cummings DE, 2002; Purnell JQ, 2007; Broglio F, 2001).

*Ghrelin y otras enfermedades*

La caquexia se define como la pérdida de peso no intencional en la cual se pierden masa magra y grasa. La desnutrición en este escenario es a menudo muy difícil de tratar y se asocia con un empeoramiento del trastorno subyacente. Los niveles plasmáticos de ghrelin se han encontrado elevados en los individuos con menor IMC en comparación con aquellos con IMC normal o superior (Huang et al, 2007). Algunos estudios de pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva (ICC), la enfermedad pulmonar obstructiva (EPOC) y el cáncer no han demostrado una diferencia significativa en las concentraciones de ghrelin entre individuos sanos y pacientes cuando se compara el IMC (Nagaya et al, 2001; Madeddu C, 2009). A diferencia de la caquexia por cáncer, la caquexia asociada con la insuficiencia renal crónica (IRC) se asocia únicamente con el aumento en los niveles totales de ghrelin (acil-ghrelin no se incrementan) (Yoshimoto et al., 2002). Hasta ahora, los intentos de tratamiento de la caquexia por cáncer con el ghrelin han requerido dosis supra-fisiológicas de ghrelin, pero han demostrado efectos positivos casi universalmente en el apetito. Esto sugiere que el efecto del ghrelin en los centros estimulantes del apetito no está saturado en el marco de la caquexia por cáncer (DeBoer, 2008). En resumen, los síndromes de caquexia tienen niveles elevados de des-acil ghrelin basal. No se sabe si estos niveles elevados de des-acil ghrelin son la causa de los síntomas o una respuesta fisiológica a la caquexia. La mayoría de los estados de la enfermedad que resultan en la caquexia también demuestran una elevación de la ghrelin acilo que se puede esperar después de la pérdida de la masa corporal. Los primeros estudios con agonistas del GHS-R son prometedores para el tratamiento de los síndromes de caquexia (Garcia and Polvino, 2007).

## INTRODUCCION

### *Ghrelin y Síndrome de Prader-Willis*

El síndrome de Prader-Willi (SPW) es un síndrome de obesidad genética caracterizada por la deficiencia de GH. Los niños con SPW presentan un aumento rápido de peso en la infancia, junto con un apetito voraz. Otros desórdenes clínicos asociados al SPW incluyen el hipogonadismo, el control aberrante de la temperatura corporal y alteraciones del sueño. Aunque la disfunción hipotalámica se piensa que es la base para muchas de las características del SPW, los mecanismos subyacentes siguen siendo desconocidos.

Los niveles elevados de ghrelin total se demostraron por primera vez entre los adultos con SPW. Posteriormente se demostró que los niños con SPW en comparación con los controles de peso iguales que tienen de 3 a 4 veces niveles de ghrelin más altos (Haqq, 2003). También se ha demostrado que durante el ayuno los niveles de ghrelin fueron significativamente mayores en el grupo de SPW en comparación con los grupos control con obesidad mórbida (niños con mutaciones en los genes individuales MC4R y los individuos con deficiencia de leptina). Los estudios anteriores y otros que replican estos hallazgos demuestran que la hiperfagia que se observa en el SPW puede ser secundaria debido a los elevados niveles de ghrelin.

#### IV.-PÉPTIDOS HIPOTALÁMICOS Y PERIFÉRICOS QUE INHIBEN LA INGESTA (ANOREXIGÉNICOS)

##### ***Transcripto regulado por cocaína y anfetaminas (CART)***

CART se identificó en un principio por PCR como un nuevo ARNm resultante posterior a la administración de estimulantes psicotrópicos (Douglass J, 1995). El producto proteico del ARNm tiene una secuencia líder y varios pares de aminoácidos básicos. El péptido maduro contiene varios sitios de unión, con lo que CART puede ser procesado postranscripcionalmente en fragmentos cortos y largos. Ambas formas se encuentran en ratas pero solo las formas de péptidos cortos son encontradas en humanos (Douglass J, 1995). Los péptidos CART están localizados en diferentes áreas específicas del hipotálamo, incluyendo el PVN, DMH, PFN, LHA, ARC, así como en hipófisis y glándula adrenal, sugiriendo un eje hipotálamo-hipófisis-glándula adrenal. Las neuronas CART están asociadas con la recompensa, procesamiento sensorial, estrés, regulación endócrina y alimentación (Koylu EO, 1997).

Las ratas *fa/fa* y los ratones *ob/ob* tienen niveles reducidos del ARNm de CART. (Larsen *et al.*, 2000). El ayuno atenúa la expresión del ARNm de CART en el hipotálamo, demostrando que la regulación del ARNm de CART se encuentra relacionada a la disponibilidad de alimentos y al estado hormonal periférico. La expresión de CART en el ARC y PVN es estimulada en ratas sometidas a dietas altas en grasas comparadas con ratas con dietas bajas en grasas, estos cambios posiblemente se deban en parte al aumento de leptina tras las dietas altas en grasas, ya que los niveles de CART se correlacionan a los de leptina (Elias CF, 1998).

La administración aguda central del péptido CART disminuye de una forma dosis-dependiente a la ingesta de alimentos en ratones y reduce la ingesta

## INTRODUCCION

estimulada por NPY (Lambert PD, 1998). La administración crónica central de este péptido disminuye la ingesta de alimentos y causa una pérdida de peso en ratas delgadas y obesas *fa/fa*. Además anticuerpos contra CART causan un incremento en la ingesta nocturna. Otros efectos inducidos por CART incluyen un efecto inhibitorio de la secreción y vaciamiento gástrico, incremento de los niveles circulantes de ácidos grasos libre y estimulación de UCP1, 2 y 3 en el tejido adiposo marrón, tejido adiposo blanco y músculo lo que sugiere un efecto en la termogénesis (Kong WM, 2003).

Existen evidencias que respaldan una relación entre CART y otros péptidos hipotalámicos involucrados en la homeostasis energética. En el ARC, todas las neuronas de CART expresan POMC, estableciendo una relación entre CART y el sistema de las melanocortinas en la estimulación de la termogénesis y gasto energético y en la mediación de acciones inhibitorias sobre la ingesta (Elias CF, 1998). Otros estudios demuestran la coexistencia de CART junto con MCH en el hipotálamo lateral y área perifornical (Broberger, 1999). Al igual que las melanocortinas, CART es estimulado en condiciones de balance energético positivo, en asociación con un aumento de leptina, restringiendo la ingesta de alimentos y activando al sistema nervioso simpático, previniendo la ganancia de peso corporal.

### ***Melanocortinas***

Las melanocortinas son péptidos bioactivos derivados del precursor pro-opiomelanocortina (POMC) que es un precursor de 267 residuos de aminoácidos, el cual es sintetizado en el ARC así como en la hipófisis anterior, aunque también se localiza en el sistema inmune (Broberger, 1998). El proceso postranscripcional de POMC produce un número de péptidos con actividades biológicas distintas. En la adenohipófisis, su procesamiento

produce hormona liberadora de la adrenocorticotropina (ACTH), en el ARC, ACTH es seguidamente procesado a  $\alpha$ -MSH, mientras la  $\beta$ -lipoproteína dará a  $\beta$ -endorfina (Broberger, 1998). Las acciones biológicas de las melanocortinas están mediadas por interacciones con al menos cinco receptores asociados a proteínas G, siendo MCR-3 y MCR-4 predominantemente los que tienen una mayor relevancia en cuanto a las acciones metabólicas, MCR-3 se encuentra localizado en el hipotálamo, especialmente en el ARC incluyendo en las neuronas POMC y en el sistema límbico. MCR-4 está más ampliamente distribuido a través del todo el cerebro y es altamente expresado en diferentes áreas hipotalámicas tales como el ARC, PVN y PFLH (Liu H, 2003; Mountjoy KG, 1994).

Otras evidencias relacionan a las melanocortinas con leptina, señalando que la leptina incrementa los niveles de POMC para ejercer sus acciones sobre el balance energético (Cheung CC, 1997).

El perfil de expresión del ARNm de POMC muestra un ritmo circadiano, con niveles bajos que se alcanzan en el inicio del ciclo de la alimentación cuando los niveles de leptina son bajos y picos más altos al final del ciclo. La relación entre leptina y las neuronas de POMC, se ha demostrado por el hecho que las neuronas de POMC expresan receptor para la leptina y que esta hormona estimula la expresión de POMC (Elias CF, 1999). Además se ha visto que ratones *ob/ob* muestran una reducción substancial de POMC en el ARC, hecho que es revertido por la administración de leptina. La obesidad acompañada con altos niveles de leptina se asocia con un incremento en los niveles de ARNm de POMC. Mientras los estados de privación de alimentos y lactancia, que tienen bajos niveles de leptina se asocian con reducción de la expresión del gen de POMC (Torri C, 2002).

La leptina estimula la secreción de  $\alpha$ -MSH en el hipotálamo e induce una despolarización de las neuronas de POMC de una manera relacionada a las

## INTRODUCCION

concentraciones de la misma. Esto probablemente este mediado por canales catiónicos no específicos, así como por la reducción en la frecuencia del efecto inhibitorio de las neuronas NPY/GABA. La neuronas POMC hipotalámicas también expresan receptores para insulina, y la insulina al igual que la leptina, estimula la expresión del ARNm de POMC (Benoti C, 2002). Contrariamente a estos péptidos, ghrelin inhibe las neuronas POMC, posiblemente estimulando las neuronas NPY/GABA que aumentan su efecto inhibitorio hacia las neuronas POMC (Cowley MA, 2003). La expresión de POMC en el ARC no es afectada por el consumo de dietas altas en grasas. La administración central de  $\alpha$ -MSH o un análogo de este, producen una fuerte supresión de la ingesta de alimentos en ratones obesos (Pierroz DD, 2002). La administración crónica de  $\alpha$ -MSH induce una disminución transitoria de la ingesta pero con una reducción mantenida del peso corporal y la continua infusión de  $\alpha$ -MSH disminuye la masa grasa intra-abdominal y mejora la acción de la insulina sobre la captación de glucosa (Obici S, 2001). La inhibición de MCR-4 produce hiperfagia, incrementando la grasa corporal e hiperinsulinemia. Estos datos sugieren que las acciones de  $\alpha$ -MSH a través del MC4-R favorecen el aumento de la actividad del sistema nervioso simpático, y si a esto se le agrega una reducción de la ingesta de alimentos, produce una disminución del peso corporal (Graham M, 1997; Ollmann MM, 1997).

Por otra parte se ha visto que las mutaciones de MCR-4 en humanos se encuentran ligadas a obesidad mórbida (Farooqui JZ, 1993). Además la estimulación de MC4-R por las melanocortinas reproduce importantes características de la caquexia (disminución de la ingesta de alimentos y del peso corporal e incremento de la tasa metabólica) (Marsh DJ, 1999).



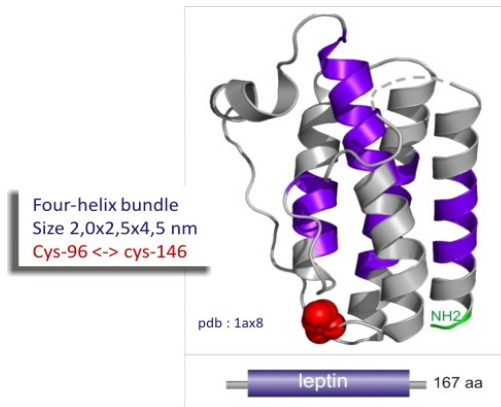
## ***LEPTINA***

### *Características generales*

Previo al descubrimiento de la leptina, experimentos de parabiosis con ratones genéticamente obesos (ob) y diabéticos (db) realizados por Coleman et al, predecían la existencia de un factor circulante capaz de transmitir información desde la periferia al cerebro indicando la existencia de alta cantidad de reserva energética (Coleman DL, 1973; Coleman DL, 1979). Esto se confirmaría en 1994 cuando Friedman et al identificaron el gen ob, que codificaba una hormona que se expresaba especialmente en el tejido adiposo, y la denominaron leptina (del griego leptos, que significa delgado), y en los años posteriores con la identificación de su receptor (Lepdb, Lepfa) (Tartaglia LA, et al 1995; Chen H, 1996).

La leptina es un péptido de 16 KDa y consta de 167 aa. (Figura 7). Es una hormona secretada por el tejido adiposo blanco en proporción a la cantidad total de masa grasa, el tamaño de los adipocitos y su contenido en triglicéridos; así aumenta en sujetos obesos y cae con la pérdida de peso. Se expresa también, aunque a niveles mucho menores en: BAT (tejido adiposo marrón), estómago, intestino, epitelio de glándula mamaria, placenta, músculo esquelético. Circula en sangre y cruza la barrera hematoencefálica (BHE) mediante un mecanismo saturable dependiente de receptor (Ahima et al., 2000).

## INTRODUCCION



**Fig. 7:** Estructura de leptina humana, cuatro doble hélices con 167 residuos de aminoácidos

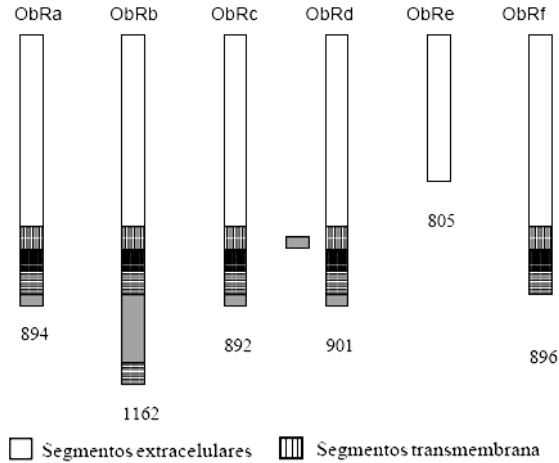
### *Leptina-Receptor de Leptina*

Han sido identificadas numerosas isoformas distintas del receptor de leptina obtenidas por procesamiento alternativo del gen *obR*; por ejemplo en ratón se han encontrado al menos 5 (ObRa-ObRe). Las distintas isoformas se pueden agrupar en tres tipos: secretadas, cortas y larga (Lee GH, 1996) (Figura 8).

- Las isoformas secretadas: son producto de divisiones alternativas en las distintas especies o los productos de escisión de las formas unidas a la membrana del ObR. Son solo dominios extracelulares que se unen a la leptina circulante, quizás regulando la concentración de leptina libre.

- Las isoformas cortas (ObRa, ObRc, ObRd y ObRf en ratón), presentan los 17 exones pero con los aminoácidos 3-11 truncados. La isoforma ObRa es altamente conservada, y se expresa en el endotelio de los capilares del cerebro y de órganos periféricos, por lo que se ha propuesto que esta es la isoforma que media el transporte de la leptina a través de la BHE.

- La única isoforma larga es la ObRb: consta de 17 exones y se diferencia en la porción intracelular (Lee GH, 1996).



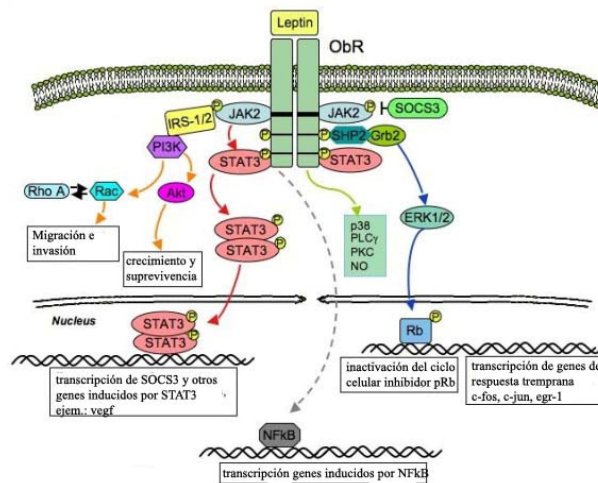
**Fig. 8:** Representación esquemática de la estructura general de los diferentes subtipos de receptores de leptina (ObR). Las regiones de alta homología entre los diversos subtipos están representadas por los mismos símbolos, el número total de residuos de aminoácidos está indicado en la parte inferior del esquema correspondiente a cada subtipo.

De todas las isoformas la clave para la acción de la leptina es la **ObRb**. Este receptor se expresa especialmente en núcleos del hipotálamo, incluyendo el ARC, DMH o el VMH, y en otras regiones cerebrales tales como núcleo tracto solitario (NTS), núcleo dorsal motor del vago (DMX) y el hipocampo, implicadas también en el control de la ingesta, metabolismo y sistemas neuroendocrinos (Ahima RS, 2000; Chua SC, 1997).

### *Leptina-Mecanismo de Acción*

La leptina se une a la forma larga del receptor ObRb que es la esencial para mediar el efecto de esta hormona sobre la regulación del balance energético y del peso corporal a largo plazo; de hecho es la isoforma ausente en el ratón *db/db*.

## INTRODUCCION



**Fig. 9:** Receptor de leptina y algunas vías a través de los cuales regula algunos genes

Este receptor se expresa en dos poblaciones neuronales del ARC, claves en la regulación de la ingesta: los orexigénicos NPY/AgRP y los anorexigénicos POMC/CART. Así, la leptina estimula la producción de neuropéptidos anorexigénicos y suprime los niveles de los orexigénicos, como se demuestra en casos de déficit de actividad de leptina tales como el ayuno, en los que se estimula la ingesta mediante la supresión de la síntesis de POMC y el aumento de los niveles de expresión de NPY/AgRP (Fruhbeck G, 2006; Kohno D, 2003). Además, la leptina puede ejercer su acción sobre las neuronas POMC, mediante la disminución del ácido  $\gamma$ -aminobutírico, y sobre las neuronas NPY/AgRP, disminuyendo la secreción de AgRP y mediante la activación de canales K-ATP (Cowley MA, 2001). Datos más recientes sugieren que la leptina puede influir en la ingesta mediante la modificación de la plasticidad de las sinapsis entre distintas poblaciones neuronales del ARC. Pinto et al., 2004, demostraron que ratones

*ob/ob* tenían incrementadas las señales excitadoras sobre las neuronas NPY/AgRP y disminuidas sobre POMC/CART, mientras que se conseguía revertir este efecto con la administración de leptina. *Bouret et al* demostraron que la densidad de innervación del PVN, DMN y LHA desde el ARC es inferior en ratones *ob/ob* comparado con los *wt*. En este caso, la administración de leptina conseguía revertir el efecto si era administrada en período perinatal pero no en estado adulto (Heymsfield SB, 1999). Tanto en roedores como en humanos la obesidad inducida por dieta parece ir asociada a resistencia a la leptina. La leptina también actúa sobre otras neuronas: disminuye la expresión génica de MCH, galanina (GAL) y orexinas e incrementa la de GALP (galanin like peptide) en el ratón *ob/ob* (López M, 2000; Sahu A, 1998; Gundlach AL, 2002). Ghrelin y leptina interactúan funcionalmente de manera que ghrelin bloquea los efectos de la leptina en la ingesta, mientras que la administración previa de leptina atenúa los efectos de ghrelin en la ingesta a través de las neuronas de NPY. Así, la regulación de los efectos de ghrelin en las neuronas del hipotálamo, particularmente en las neuronas de NPY/AgRP, puede ser uno de los mecanismos importantes de la señalización de la leptina a nivel del hipotálamo (Niswender KD, 2003; Shintani M, 2001).

### *Leptina-vías de señalización*

La leptina, mediante su unión a la isoforma larga del receptor ObRb, activa la vía JAK-STAT. La activación de JAK2, mediante autofosforilación, lleva a la fosforilación de STAT 3, dando lugar a la translocación de STAT3 al núcleo y la transcripción de distintos neuropéptidos (Niswender KD, 2001). También se ha descrito la activación de STAT5 mediante JAK2, aunque ésta parece de menor importancia a nivel hipotalámico (ver figura 9).

## INTRODUCCION

En las neuronas hipotalámicas también activa una vía común con la insulina: IRS-PI3K. Ambas hormonas inhiben la ingesta activando IRS2 (sustrato 2 de receptor de insulina), MAPK, ERK, AKT y fosfatidilinositol 3 kinasa. Datos más recientes sugieren que los sensores celulares de energía, AMPK y mTOR, son también importantes mediadores de la acción de la leptina a nivel hipotalámico, de modo que se puede inhibir el efecto de la leptina evitando la caída de la actividad hipotalámica de AMPK y mediante la prevención del aumento de la actividad de mTOR (Minokoshi Y, 2002; Cota D, 2006).

La señalización de la leptina a través de la vía JAK2-STAT3 puede estar regulada mediante una retroalimentación negativa ejercida por la proteína supresora de citocinas SOCS3 y por la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B). Ratones con delección neuronal del gen *socs3* y también ratones con deficiencia heterocigota de SOCS3, presentaban una mayor sensibilidad a la leptina que los *wildtype* y estaban protegidos contra el desarrollo de obesidad inducida por dieta (Baskin DG, 2000; Zigman JM, 2003). Mientras que ratones sin SOCS3, especialmente en neuronas POMC, presentaban un fenotipo similar sugiriendo que las neuronas POMC en el ARC pueden ser el lugar hipotalámico donde se produce la resistencia a leptina, que caracteriza a la obesidad. Los ratones *Ptb1b*  $-/-$  son resistentes a la obesidad inducida por dieta alta en grasas y no sufren resistencia a leptina, pudiendo ser también un factor importante en el desarrollo de resistencia a leptina (Bence KK, 2006).

***Colecistocinina (CCK)***

La colecistocinina es la hormona prototipo de la saciedad. La CCK es ampliamente distribuida en el tracto gastrointestinal, pero es sintetizada predominantemente en el duodeno y yeyuno. Su liberación hacia los tejidos y a la circulación responde a la presencia de alimentos en el intestino, especialmente a comidas ricas en grasa y proteínas, elevando sus niveles aproximadamente 5 veces más postprandialmente. Sus principales acciones son inhibir la ingesta de alimentos, retrasar el vaciamiento gástrico, estimular la secreción de enzimas pancreáticas y estimular la contracción de la vesícula biliar. Todas estas acciones en su conjunto promueven una efectiva digestión de las grasas y proteínas en el intestino delgado haciendo coincidir la llegada de nutrientes con la capacidad de digerirlos (Dockray GJ, 1978; Moran TH, 2000).

Para sus acciones CCK utiliza dos tipos de receptores (CCK-A, CCK-B) asociados a proteínas G. En ratas, los receptores CCK-A se encuentran principalmente en el páncreas, en neuronas aferentes vagales y entéricas, cerebro e hipotálamo dorsomedial, área postrema, núcleo del tracto solitario. Los receptores tipo CCK-B se encuentran distribuidos a través de todo el cerebro, presentes en vías aferentes vagales así como dentro del estómago (Dockray GJ, 1978; Moran TH, 2000)

Estudios diversos han demostrado que la administración de bajas dosis de CCK (forma sulfatada) en humanos y animales inhibe la ingesta de alimentos reduciendo la cantidad de alimentos y la duración, teniendo como efectos secundarios a altas dosis, la presencia de náuseas y aversión al gusto, todos estos efectos son mediados por el receptor tipo CCK-A (Gibbs J, 1973).

## INTRODUCCION

Los receptores CCK-A expresados en neuronas vagales aferentes son particularmente importantes dianas para CCK para producir las sensaciones de saciedad, así como mediar los efectos de la inhibición del vaciamiento gástrico y estimulación de la secreción de enzimas pancreáticas (Dockray GJ, 1978).

Los antagonistas para el receptor de CCK-A, incrementan la ingesta de calorías y reducen la sensación de saciedad, sugiriendo el importante papel que desempeña CCK en la regulación del apetito (Beglinger C, 2001). La CCK es un modulador del apetito a corto plazo, su vida media es de 1-2 minutos, y no es efectivo en reducir la cantidad de comida si el péptido es administrado más de 15 minutos antes de las comidas (Gibbs J, 1973). Se ha visto que la administración crónica de CCK resulta en la pérdida de peso, efecto que puede explicarse por la acción conjunto de CCK con leptina (Matson CA, 2000). Otros estudios demuestran que la administración crónica de anticuerpos contra CCK o antagonistas de CCK-A resulta en la ganancia de peso en modelos animales pero sin incremento significativo de la ingesta de alimentos. En ratones knock-out para el receptor de CCK-A se desarrolla hiperfagia y obesidad (McLaughlin CL, 1985; Meereis-Schwanke K, 1998). Con todos las evidencias anteriores sobre CCK en relación a su papel en la ingesta de alimentos, su uso podría pensarse como una buena terapia anti-obesidad, pero datos en animales han demostrado que la administración preprandial repetida de CCK reduce la ingesta de alimentos pero incrementa la frecuencia de comidas sin resultados en el peso corporal, confirmando que la administración continua de CCK es inefectiva después de las primeras 24 horas.



***Polipéptido YY y polipéptido P***

Estos polipéptidos (PYY, PP) junto con NPY, son miembros de una familia de péptidos PP plegados y son factores circulantes puntuales de la saciedad. Todos ellos tienen 36 residuos de aminoácidos, contienen residuos de tirosina, y requieren amidación en el carboxilo terminal para su acción biológica. Sus efectos son ejercidos a través de la familia de receptores Y que son receptores asociados a proteínas G, cuatro de ellos han sido identificados Y1, Y2, Y4 y Y5, los cuales son expresados en el hipotálamo (Larhmmar D, 1996). Y1 y Y5 se expresaron como receptores para las acciones orexigénicas de NPY, y el Y2 es expresado en las neuronas de NPY, pero media las acciones de PYY, mientras que el Y4 media las acciones de PP. El PYY es secretado por las células L entero endócrinas. Estas células se encuentran a través de todo el tracto gastrointestinal, pero particularmente en la porción distal. El patrón de secreción de PYY es, al contrario del de ghrelin, liberado a la circulación después de las comidas y suprimido por el ayuno. Además de los efectos de PYY sobre la ingesta, también se ha comprobado que incrementa la absorción de fluidos y electrolitos del íleon posterior a una comida e inhibe las secreciones gástricas y pancreáticas, contracción de la vesícula biliar y vaciamiento gástrico (Adrian TE, 1985).

En humanos la infusión intravenosa de PYY<sub>3-36</sub> reduce el apetito y la ingesta de alimentos cerca de un tercio y al contrario de leptina, los niveles circulantes de PYY no se encuentran elevados en obesos, y los sujetos obesos retienen completamente la sensibilidad a PYY<sub>3-36</sub> y se ha reportado que estos sujetos tienen niveles bajos de PYY en ayuno y postprandialmente (Batterham, 2002; Chelikan PK, 2006).

## INTRODUCCION

Aunque se conoce que la administración periférica de PYY inhibe la ingesta de alimentos, se ha visto que la administración intracerebroventricular de PYY<sub>3-36</sub> estimula la ingesta de comida, probablemente a través de los receptor tipo Y1 y Y5 en el núcleo paraventricular, que son neuronas diana de segundo orden para las neuronas orexigénicas NPY del ARC (Wren AM and Bloom SR, 2007).

Aunque otros estudios demuestran una acción anorexigénica de los niveles circulantes de PYY<sub>3-36</sub> en el núcleo arcuato. *c-fos* es observado en el núcleo arcuato en respuesta a la periférica administración de PYY<sub>3-36</sub> y también en la inyección directa en el ARC. Esta acción se cree que es a través de los receptores Y2 en las neuronas orexigénicas NPY. Otros datos respaldan estos resultados mostrando inhibición de la ingesta al utilizar agonista de los receptores Y2, mientras la acción de PYY es ausente en ratones Y2 knock-out. Por lo tanto PYY reduce la expresión de NPY en el núcleo arcuato, desinhibiendo a las neuronas POMC. Aunque la desinhibición neural de POMC no parece ser necesaria para la acción de PYY, dados los efectos observados en ratones knock-out para melanocortinas (Batterham RL, 2002; Abbott CR, 2005).

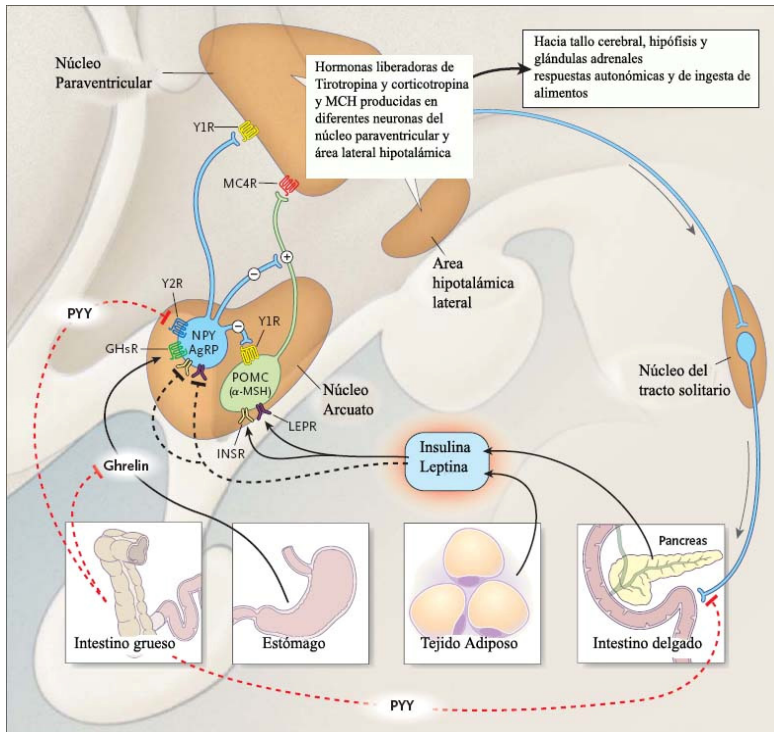
Al igual que PYY, el péptido PP es liberado en respuesta a las comidas, en proporción a la carga calórica, e inhibe el apetito. El PP es producido en el páncreas endócrino y exocrino, colon y recto. Las hormonas pancreáticas y gastrointestinales pueden regular los niveles de PP. Ghrelin estimula rápidamente la liberación de PP, mientras somatostatina reduce sus niveles, PP se une con mayor afinidad a los receptores tipo Y4 (Tracks NS, 1980).

La administración periférica de PP a niveles fisiológicos ha mostrado una reducción en la ingesta de alimentos, en asociación con una reducción del vaciamiento gástrico y la expresión de ghrelin e incremento del tono vagal.

PP también incrementa el consumo de oxígeno y la actividad simpática, lo que sugiere un aumento del gasto energético (Asakawa A, 2003).

En humanos la infusión de PP reduce la ingesta de alimentos sin alterar el vaciamiento gástrico. Aparte de los efectos agudos del PP sobre el apetito y la ingesta de alimentos, se ha observado que el PP modula el balance energético a largo plazo (Ueno N, 1999). Ratones con sobreexpresión de PP tiene un fenotipo delgado con reducción de la ingesta de alimentos. Los niveles del PP se han encontrado aumentados en individuos de anorexia nerviosa, y existen trabajos que muestran niveles suprimidos del PP en sujetos obesos, aunque los efectos del PP sobre el apetito y peso corporal en sujetos obesos humanos, son desconocidos. Al igual que PYY, la administración central de PP, aumenta la ingesta de alimentos en ratas (Clark JT et al, 1984)

## INTRODUCCION

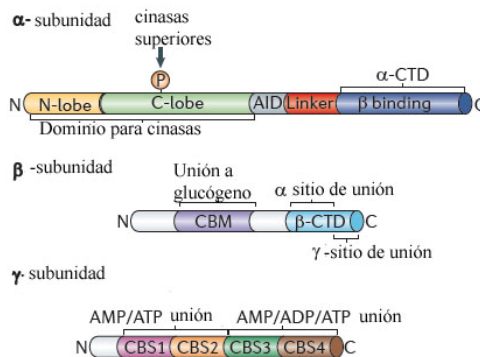


**Fig. 10:** Diagrama esquemático resumen del hipotálamo; el núcleo arcuato contiene neuronas que son capaces de estimular o inhibir la ingesta de alimentos; Y1 y Y2, subtipos de receptores de NPY; MC4R, receptor tipo 4 de melanocortinas; HGSR, receptor de secretagogos de hormona del crecimiento; LEPR, receptor de leptina; INSR, receptor de insulina

## V.-SEÑALES INTRACELULARES

### **AMPK**

Las células normales generalmente mantienen una amplia relación entre ATP y ADP, típicamente de 10:1, esto significa que existe un almacenamiento de energía que puede utilizarse para procesos que requieren de suficiente energía. La mayoría de las células mantiene su relación ATP: ADP dentro de límites estrechos, lo que indica que el grado de síntesis de ATP exactamente coincide con el grado de consumo de ATP, en nuestras células, esto se logra gracias a sofisticados sistemas que mantienen este balance y la proteína cinasa activada por AMP (AMPK) juega un papel importante en este proceso. AMPK son complejos heterotriméricos consistentes en una subunidad  $\alpha$  catalítica y subunidades  $\beta$  y  $\gamma$ , reguladoras, cada una de las cuales es codificada por dos o tres genes distintos ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ ,  $\gamma 3$ ). La región C-terminal de la subunidad  $\alpha$  son requeridas para formar un complejo con la subunidad  $\beta$  y  $\gamma$  (Pang T et al, 2007; Chen L et al, 2009) (Figura 11).



**Fig. 11:** Estructura de AMPK; los complejos de AMPK son heterotrímeros compuestos por subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ - y  $\gamma$  en una relación 1:1:1. El dominio del carboxilo terminal de la subunidad  $\beta$  ( $\beta$ -CTD) forma el núcleo del complejo, uniéndose a  $\alpha$ -CTD y al amino terminal de la subunidad  $\gamma$  (antes CBS1). AID: dominio auto inhibitorio; CBM, modulo de unión a carbohidratos

## INTRODUCCION

AMPK es activada por 5'-AMP de tres formas distintas, siendo todas ellas antagonizadas por altas concentraciones de ATP. Cuando AMP se une, causa una activación alostérica de AMPK y hace que ésta última sea un mejor sustrato para otras kinasas reguladoras, dentro de éstas, se ha identificado recientemente a LKB1 (liver kinase B1) la cual activa a AMPK por fosforilación de la subunidad  $\alpha$  en residuos de treonina específicos (Thr172) y esta fosforilación causa la activación de otras proteínas kinasas en una mayor cantidad (Hawley et al, 1996). LKB1 forma un complejo con dos subunidades accesorias: STRAD y MO25. Estas tres subunidades son requeridas para su completa actividad. Se ha demostrado que los ratones *LKB1*-knockout mueren durante el desarrollo embrionario, demostrando el papel importante que desempeña LKB1 en la activación de AMPK. La estimulación por AMP solo es observada si se encuentra presente el complejo  $\alpha\beta\gamma$  intacto, y no cuando el dominio cinasa es aislado. Es importante destacar que el residuo de treonina de AMPK es conservado en todas las variantes de AMPK en todos los eucariotas y la mutación de este residuo en levaduras causa una pérdida total de su función in vivo. En adición a esto la unión de AMP a AMPK inhibe la desfosforilación de la treonina 172 por proteínas fosfatasas (Hawley et al, 2003).

Otra vía alternativa para la activación de AMPK, involucra a CaMKK $\beta$ , la cual desencadena la activación de AMPK en respuesta al incremento de Ca<sup>++</sup> sin necesariamente requerir cambios en los niveles de AMP o ADP (Fogarty S, 2010).

AMPK es activada por muchas señales de estrés que disminuyen el ATP celular, tales como el envenenamiento metabólico, estrés oxidativo, hipoxia o privación de nutrientes. Estos se pueden considerar como situaciones de estrés patológico que interfieren con la producción de ATP. AMPK puede

ser activado por estrés fisiológico causado por la actividad del músculo esquelético, tejido que consume grandes cantidades de ATP. Aun más, se ha demostrado que la relación entre el ejercicio y AMPK es responsable del efecto benéfico de realizar ejercicio regularmente, previniendo la obesidad y otras enfermedades. Por otra parte, se ha comprobado que AMPK media la estimulación que realiza leptina sobre la oxidación de ácidos grasos en el músculo esquelético. La activación de AMPK en el músculo también incrementa la captación de glucosa y la biogénesis mitocondrial, y esto sugiere que leptina podría por lo tanto, incrementar el gasto energético estimulando la oxidación de glucosa así como de los ácidos grasos en el músculo. Los niveles de leptina, pueden hacer que los adipocitos pasen de la síntesis de grasas a la oxidación de ácidos grasos, y esto se encuentra asociado con la activación de AMPK en estas células sugiriendo que AMPK estimula la combustión de grasas cuando su almacenamiento es excesivo (Minokoshi Y, et al, 2004; Yang Y, et al., 2011).

En otros estudios se han establecidos relaciones entre AMPK y la ingesta de alimentos en mamíferos, AMPK es inhibida en roedores con altos niveles de glucosa, leptina e insulina, todos los cuales reprimen la ingesta de alimentos, mientras al contrario de lo anterior, AMPK es activada por ghrelin, la única hormona orexigénica de nuestro organismo y que estimula la ingesta de alimentos (Anderson et al, 2004). Estos cambios en AMPK parecen desencadenar cambios subsecuentes en la ingesta, hecho comprobado por la inyección directa en el hipotálamo de un activador de AMPK, el 5-aminoimidazol 4 carboxamida ribosido (AICAR), produciendo un aumento de la ingesta. Otro dato interesante es el hecho de que la leptina inhibe a AMPK en el hipotálamo pero activa a este mismo en el músculo esquelético. Se ha determinado también que el sistema de AMPK se encuentra

## INTRODUCCION

involucrado en la ingesta de alimentos en respuesta a los niveles bajos de glucosa en mamíferos (Merrill G, 1997).

En general, la activación de AMPK regula vías biosintéticas como la síntesis de ácidos grasos y colesterol, pero cambia a vías catabólicas que generan ATP, como son la oxidación de ácidos grasos ( $\beta$ -oxidación), captación de glucosa y glucólisis. Esto lo logra no solo con la acción directa sobre la fosforilación, sino también a través de la estimulación de la expresión génica, como la estimulación de los transportadores de glucosa GLUT4 y genes mitocondriales en el músculo esquelético y disminuyendo la expresión de genes que codifican enzimas de la síntesis de ácidos grasos y gluconeogénesis en el hígado. AMPK regula positivamente la expresión de PGC1  $\alpha$ , el cual está involucrado en el control de la expresión de genes mitocondriales en el músculo, pero regula negativamente los factores de transcripción SREBP-1c y HNF4 $\alpha$ , los cuales se encuentran involucrados en la expresión de genes relacionados a la lipogénesis, captación de glucosa y glucólisis en hígado (Li Y, et al, 2011). También AMPK fosforila al ubicuo co-activador p300 en sitios específicos, reduciendo su capacidad para unirse a receptores hormonales nucleares tales como PPAR- $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ ) (Narkar VA, et al, 2008). Diferentes estudios demuestran que AMPK inhibe la vía de mTOR a través de la fosforilación de TSC2 (tuberous sclerosis complex 2) TSC1 y TSC2 forman un complejo que regulan negativamente el crecimiento celular y actúa a un nivel superior de TOR causando su inhibición. AMPK fosforila a TSC2 en dos sitios, y esto produce la inhibición de mTOR (Ji C, et al, 2010; Alexander A, et al, 2010).

En hígado la activación de MAPK disminuye la expresión de enzimas de la gluconeogénesis como la fosfoenolpiruvato carboxilasa y la glucosa 6



fosfatasa. Otra clase de enzimas que son reguladas negativamente en el hígado son las involucradas en la síntesis de ácidos grasos, como FAS y ACC1, esto asegura que la síntesis de ácidos grasos se encuentre inactiva (Merrill G, 1997).

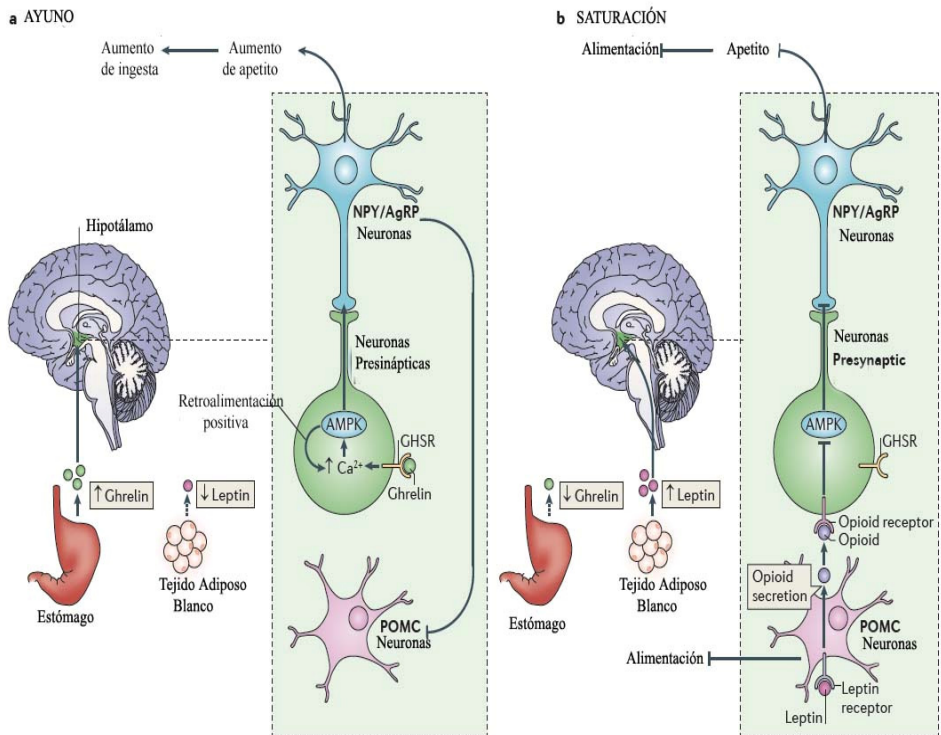
### *AMPK y la regulación del apetito*

En mamíferos AMPK puede influir en el metabolismo y en el balance energético, particularmente a través de sus acciones sobre áreas críticas del hipotálamo involucradas en la ingesta de alimentos (ver figura 12) (Claret M, et al, 2007). Como se sabe el principal centro del control del apetito es el ARC. Ensayos de kinasas en regiones hipotalámicas de ratones muestran que las hormonas que inhiben la ingesta, como la leptina, inhiben la isoforma  $\alpha 2$  de AMPK, mientras aquellas que promueven la ingesta, como ghrelin o los cannabinoides, activan a AMPK. La inyección directa hacia el hipotálamo de activadores farmacológicos de AMPK promueve la ingesta de alimentos. Usando agentes farmacológicos, se demostró que ghrelin activa a AMPK a través de la vía  $\text{CaMKK}\beta$  en las neuronas pre sinápticas a través del GHSR-1a. Consistente con esto, ratones deficientes de  $\text{CaMKK}\beta$  mostraron una reducción de la expresión de NPY/AgRP pero no de POMC y su ingesta en respuesta a la administración de ghrelin (Yang Y, et al, 2011; Claret M, et al, 2007).

AMPK parece tener actividad en el VMH controlando el balance energético total. Hay evidencias que involucran a AMPK en la detección de niveles sanguíneos bajos de glucosa promoviendo la liberación de hormonas contrareguladoras (adrenalina y glucagon) que estimulan la liberación de glucosa por el hígado. Las hormonas tiroideas también inhiben a AMPK en esta región, incrementando la actividad de los nervios simpáticos, lo cual

## INTRODUCCION

incrementa el gasto energético promoviendo la oxidación de los ácidos grasos el músculo y el tejido adiposo marrón (McCreimmon RJ, 2008).



**Fig. 12:** Regulación de la conducta alimenticia por AMPK sobre la modulación de neuronas NPY y AgRP y POMC. En el estado de ayuno ghrelin estimula a AMPK en neuronas presinápticas que actúan a un nivel superior de las neuronas NPY/AgRP a través de la vía CaMKKβ (Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-activated protein kinase kinase-β). Esto libera Ca<sup>2+</sup> intracelularmente, creando una retroalimentación que causa una continuada liberación de neurotransmisores hacia las neuronas NPY/AgRP aún cuando cesa la estimulación de ghrelin. La alimentación continúa hasta que las neuronas POMC son estimuladas por la señal de saciedad, la leptina. La actividad de estas neuronas permite la liberación de opiodes que inhiben a AMPK en neuronas presinápticas a NPY/AgRP, cambiándolas a un estado inactivo.

### **SIRTUINAS**

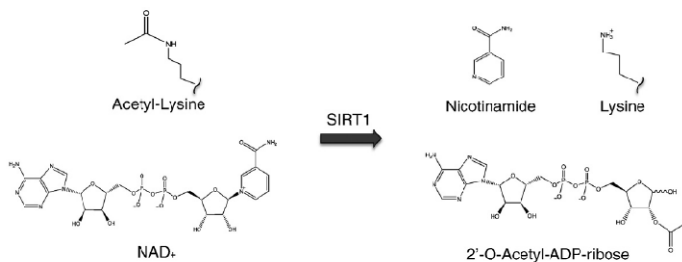
La restricción calórica (RC), una reducción del 20-40 % en el consumo de calorías por debajo de la ingesta *ad libitum* sin malnutrición, aumenta la esperanza de vida de numerosos organismos y retrasa el desarrollo de patologías asociadas a la edad, por lo tanto extiende la duración de una vida saludable. Estudios realizados en monos Rhesus indican que la restricción calórica retrasa el inicio de enfermedades y mortalidad, sugiriendo que la RC puede influenciar la longevidad y la salud de los primates. Sin embargo, la extensión de la esperanza de vida en los humanos producida por la RC, aún está por determinarse. Aun así la RC puede mejorar muchas de las patologías asociadas con obesidad y síndrome metabólico, de hecho, la RC ha mostrado reducir la grasa corporal, bajar los niveles de triglicéridos séricos y el colesterol LDL, aumentar el colesterol HDL e incrementar la sensibilidad a la insulina en humanos. La identificación de drogas que mimeticen la RC, podrían proveer el efecto benéfico de la RC sin requerir una reducción de la ingesta de alimentos, y esto es actualmente un área de gran interés en la investigación médica (Lomb DJ, 2010).

Uno de los principales objetivos para tales drogas es la familia de enzimas conocidas como sirtuinas. Las sirtuinas son una amplia familia conservada de proteínas deacetilasas y ADP-ribosiltransferasas cuya característica distintiva, es el requerimiento de la forma oxidada del NAD<sup>+</sup>. Las Sirtuinas fueron primero identificadas en la levadura, *Saccharomices cerevisiae*, donde fueron implicadas en la regulación del envejecimiento replicativo de la levadura. La replicación, definida como el número de células hijas producidas por una célula madre antes de la senescencia, es ampliamente utilizada como un modelo de envejecimiento de las células en división. En algunas cadenas de la levadura, la delección de Sir2 (silent information regulator 2 protein), una de las primeras sirtuinas descubiertas, o sus

## INTRODUCCION

homólogos, previene que la RC extienda la esperanza de vida replicativa mientras que el incremento de copias de Sir2 aumenta la esperanza de vida replicativa en la ausencia de RC. Estos resultados han llevado a especular que las sirtuinas puede ser responsable de los efectos de extensión de vida producidos por la RC (Lomb DJ, 2010).

En los mamíferos se han identificado siete sirtuinas (SIRT1-7) de las cuales SIRT1 es la mejor estudiada. SIRT1 realiza una reacción que desacopla la desacetilación de una lisina y la hidrólisis del NAD<sup>+</sup>. Durante esta reacción, el NAD<sup>+</sup> es hidrolizado a nicotinamida (NAM) y O-acetil-ADP ribosa. NAM es un fuerte inhibidor de la actividad deacetilasa de SIRT1 (Figura 13).



**Fig. 13:** Sustratos y productos de la reacción catalizada por SIRT1. S. (Chung et al. / Archives of Biochemistry and Biophysics . 2010)

Los mecanismos moleculares mediante los cuales las sirtuinas median los efectos de extensión de vida de la RC en mamíferos, no están actualmente claros. Existen evidencias que indican que la activación de SIRT1 puede reproducir algunos efectos de la RC en ratones. De hecho, los ratones transgénicos que sobre-expresan sirtuinas son más delgados que los controles, metabólicamente más activos y tienen reducidos los niveles de colesterol, insulina y glucosa. Las investigaciones de las sirtuinas como potenciales mediadores de la RC han revelado, que estas participan en diversos aspectos de la biología de mamíferos como la supervivencia

celular, senescencia celular, reparación del ADN y numerosas vías metabólicas (Lomb DJ, 2010)

SIRTUINAS	Ubicación celular	Sustrato	Función
SIRT1	Núcleo, citoplasma	NK-kB, p53, FOXO	Sobrevivencia celular, diferenciación, inflamación y metabolismo
SIRT2	Citoplasma	$\alpha$ -tubulina, histona H4	Metabolismo
SIRT3	Núcleo y mitocondria	ACC	Metabolismo
SIRT4	Mitocondria	ADP ribosil transferasa	Función mitocondrial
SIRT5	Mitocondria	Proteínas mitocondriales	Reparación del ADN
SIRT6	Núcleo	ADP-ribosil transferasa e histona H3	rRNA transcripción
SIRT7	Núcleo	RNA polimerasa	

**Tabla N° 2:** Familia de las Sirtuinas, su ubicación y algunas de sus funciones. (Chung et al. / *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2010).

En respaldo a la hipótesis de que Sir2 es una proteína antienvjecimiento, un número de estudios han encontrado que el compuesto polifenólico natural Resveratrol (RVS), un activador de SIRT1, produce efectos similares a la RC e incrementa la esperanza de vida de varias especies (Howitz KT, 2003). SIRT1 también es responsable del incremento de la actividad física observada en ratones sometidos a restricción calórica y ejerce importantes efectos en tejidos metabólicamente activos, tales como músculo esquelético, hígado, tejido adiposo blanco y páncreas en respuesta a la carencia de nutrientes. Consistentemente, la sobre-expresión de SIRT1 en ratones transgénicos provoca un número de características similares a los ratones sometidos a restricción calórica. Además de estas actividades metabólicas, SIRT1 controla otros procesos biológicos variados que están mediados vía

## INTRODUCCION

desacetilación de numerosos factores de transcripción como p53, Forkhead box O (FoxO), p73, E2F1, etc (Fulco, 2008).

### *Roles convergentes de SIRT1 y AMPK en el envejecimiento*

Además de tener eventos activadores comunes (restricción de glucosa, ayuno, restricción calórica, estrés oxidativo y ejercicio) las vías de señalización de AMPK y SIRT1 tienen similares efectos en la supervivencia, envejecimiento y metabolismo. Al igual que SIRT1, AMPK ha sido propuesto como una de las moléculas involucradas en regular la longevidad en mamíferos. En apoyo a esta hipótesis, la sobreexpresión de AMPK extiende la supervivencia in *Caenorhabditis elegans* y media los efectos de la restricción alimentaria y longevidad a través de la familia de los factores de transcripción FoxO1. El proceso de envejecimiento parece estar asociado con un declive en la actividad tanto de SIRT1 como de AMPK. Los niveles de proteína de SIRT1 (pero no su ARNm) se encuentran disminuidos en fibroblastos embrionarios de ratón que muestran senescencia prematura, mientras la actividad de SIRT1 está reducida en tejido cardíaco de animales de edad avanzada. Similarmente a los efectos de envejecimiento sobre SIRT1, la fosforilación de AMPK disminuye con el envejecimiento (Fulco, 2008).

### *Regulación de SIRT1 en tejidos*

Los mecanismos moleculares que llevan a la activación de SIRT1 todavía no han sido elucidados completamente, pero parece claro que existen diferentes vías de activación y represión, así como la regulación de SIRT1 parece diferir entre tejidos. Tanto la restricción calórica como el ayuno agudo han demostrado que incrementan los niveles proteicos de SIRT1 y su actividad

en grasa, músculo e hígado. SIRT1 también puede ser activado en respuesta al estrés oxidativo y al ejercicio físico (Fulco, 2008).

SIRT1 coordina el cambio metabólico en múltiples tejidos, regulando diferentes dianas moleculares. En el tejido adiposo blanco (WAT), SIRT1 regula negativamente al receptor nuclear PPAR $\alpha$ , un regulador clave de la diferenciación de adipocitos y del almacenamiento de grasa. En adipocitos, SIRT1 se encuentra sobre expresado en el ayuno. Estos efectos podrían involucrar la activación de FoxO1 debido a que FoxO1 reprime a PPAR $\gamma$ , por lo tanto estos hallazgos indican la función de SIRT1 en la inhibición de la adipogénesis, la movilización de ácidos grasos libres y la acentuación de los efectos de los  $\beta$ -adrenérgicos en WAT. Por lo tanto la activación de SIRT1 suprime el almacenamiento de grasa y promueve la movilización de grasa para ser utilizada por otros tejidos. En el músculo SIRT1 activa a PGC-1 $\alpha$ , un regulador de la biogénesis mitocondrial y de la oxidación de ácidos grasos. A nivel hepático SIRT1 fue identificado como un regulador de la gluconeogénesis, potenciando la actividad de FoxO1 para dirigir el metabolismo de la glucosa hacia la gluconeogénesis (Yang T, 2006). SIRT1 también actúa, a nivel hepático, con PGC-1 desacetilándolo en múltiples sitios de lisinas en esta proteína, la de acetilación de PGC-1 incrementa la transcripción de genes gluconeogénicos a través de la interacción con el factor 4 nuclear de los hepatocitos, a la vez que reprime los genes glucolíticos (Buler M, 2011). Es de hacer notar que la estimulación de SIRT1 sobre la gluconeogénesis opera en contra de la vía de respuesta hepática a la insulina, la cual almacena glucosa e inhibe la gluconeogénesis. A nivel del páncreas es expresado constitutivamente en células endócrinas de los islotes de Langerhans, específicamente en las células  $\beta$ . Análisis de microarrays de líneas celulares  $\beta$ , mostraron una disminución de los transcritos de la UCP (uncoupling protein 2) en células que sobre-expresan

## INTRODUCCION

SIRT1, e incremento de los transcriptos de UCP2 en células SIRT1 *ko* (Yang T, 2006).

### SIRT1 y sistema nervioso central

A nivel del hipotálamo, el ARNm de SIRT1, fue encontrado preferencialmente en el ARC, VMH, DMH, PVH, supra óptico y el núcleo supraquiásmático. Aunque en niveles bajos el ARNm de SIRT1 fue también expresado en el hipotálamo lateral. El ARNm de SIRT1 fue expresado en ocho de nueve neuronas POMC del ARC (Ramadori G, 2008). A nivel del hipotálamo, SIRT1 es crucial para las respuestas en contra de dietas que inducen a la obesidad y al desarrollo de Diabetes mellitus tipo 2 (Coppari R, 2012). Horvath et al., demostraron que la activación de SIRT1 en neuronas NPY/AgRP es determinante para su excitabilidad, lo cual es importante para cambios apropiados en procesos endocrinos que son necesarios para la adaptación a un balance energético negativo (Diano S, 2010). La inhibición farmacológica de las melanocortinas, revierte el efecto anorexigénico de la inhibición hipotalámica de SIRT1, sugiriendo que SIRT1 regula ingesta a través de la señalización de las melanocortinas. SIRT1 desacetila a FoxO1, regulando de esta manera el sistema de las melanocortinas (Cakir I, et al., 2009).



## **P53**

### *Antecedentes*

En 1979 se describía una proteína que formaba un complejo con la oncoproteína del virus SV40, el gran antígeno T (Lane and carwford 1979). Como antígeno T se había identificado la oncoproteína viral SV40 requerida para la iniciación y mantenimiento de la transformación celular. También p53 fue detectado como un antígeno tumoral, produciendo anticuerpos en tumores de células de ratón. En células SV40 transformadas, el antígeno T regulaba los niveles de la proteína p53 en una célula de tal forma que se postuló que p53 podría ser un producto oncogénico ligado al proceso de la transformación viral. Estos estudios señalaron que las funciones de la proteína p53 estaban íntimamente involucradas en la replicación viral y la tumorigénesis de pequeños ADN virales (Linzer, et al, 1979).

En la década de los '80 se aislaron varios clones de ADNc de p53 y se demostró que muchos de estos ADNc podrían transformar células en combinación con el oncogén Ras. Por lo tanto p53 se estableció como un oncogén. Pero posteriormente se descubrió que cada uno de esos clones ADNc contenía una mutación y que los clones sin esas mutaciones prevenían la transformación de las células por los oncogenes (Eliyah et al. 1984; Parada et al.1984; Eliyah et al. 1985).

Agregado a lo anterior, también se encontraron mutaciones en ambos alelos de p53 en tumores de ratones, en líneas celulares en cultivos y lo más importante, en cáncer de colon en humanos. Con estas observaciones se clasificaron a las proteínas p53 de tipo salvaje, como genes supresores de tumores.

## INTRODUCCION

Estas ideas fueron confirmadas por cuatro observaciones:

- 1.-Los pacientes humanos que heredaron un alelo mutante del gen, con el síndrome de Li-Fraumenni, desarrollaron cáncer a lo largo de su vida con un 100% de penetrancia. Algunos de estos individuos desarrollaron varios tumores independientes.
- 2.-Los ratones que tenían pérdida de la función ó mutaciones en el gen p53 (ratones knock-out) desarrollaron tumores a una edad muy joven.
- 3.-Hasta el 50% de todos los cánceres humanos, se mostraron que contenían mutaciones en ambos alelos del gen p53 (Olivier et al 2010; Robles y Harris 2010).
- 4.-La expresión aberrante de la proteína p53 se encontró en muchos tipos de tumores (Bartek et al. 1990).

Estas observaciones dejaron claro que la proteína p53 juega un papel esencial en la prevención de cánceres en humanos y animales.

Después de su descubrimiento en 1979, la proteína supresora de tumores p53 se ha convertido en una piedra angular en la comprensión de la biología molecular del cáncer. p53 ganó la atención a finales de 1980, cuando se hizo evidente que el TP53, el gen que codifica la proteína p53, se encontró mutado o alterado, en una gran proporción de los cánceres humanos, independientemente de su tipo histológico. La proteína p53 es sobre todo un supresor de la proliferación celular inadecuada, impidiendo la replicación del ADN en condiciones que ponen en peligro la integridad genética y la eliminación de las células que crecen inadecuadamente. Este efecto supresor se produce a través de la inducción de la apoptosis (por ejemplo, en las células progenitoras expuestas a daños en el ADN), senescencia ó detención

transitoria del ciclo celular (en muchas células expuestas a bajos niveles de daño genotóxico) (Baker SJ, 1989; Nigro JM, 1989).

La proteína p53 se une a secuencias específicas de ADN o elementos de respuesta (ER) y actúa como un factor de transcripción aumentando la tasa de transcripción de determinados genes que contienen estos ER. El gen p53 regula los genes de p21 y Cdc25c los que pueden iniciar una detención del ciclo celular. La proteína p53 regula BAX, PUMA, NOXA, Apaf-1 y otros genes que pueden conducir a la apoptosis de las células. p53 puede también iniciar un programa de senescencia celular que conduce a un estado terminal para la replicación de las células (Yonish-Rouach et al., 1991). Estos resultados del programa transcripcional de p53 conducen a la supresión de tumores. Los niveles de proteína p53 y su actividad se regulan y son inducibles por un número de señales de estreses diversos. La primera señal que se muestra como un modulador de la actividad de p53 es el daño del ADN. Si las cadenas sencillas o dobles del ADN son dañadas, la proteína quinasa ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) puede activar p53 como un factor de transcripción eficiente, que a su vez transcribe los genes que conducen a la detención del ciclo celular, la apoptosis o la senescencia (Kastan et al., 1991). La respuesta celular para la activación de p53 es determinada en gran parte, por la activación diferenciada de genes dianas de p53. Esta respuesta se puede producir bajo condiciones de moderado o temporal estrés, induciendo la detención del ciclo celular dependiente de p53 o la reparación del ADN antes que las células ingresen de nuevo a un estado de proliferación normal una vez que el estrés haya desaparecido. Por otra parte la respuesta de p53 ante un estrés grave o permanente, es la inducción permanente de la inhibición de la proliferación celular, a través de apoptosis o senescencia (Bensaad et al, 2005)

## INTRODUCCION

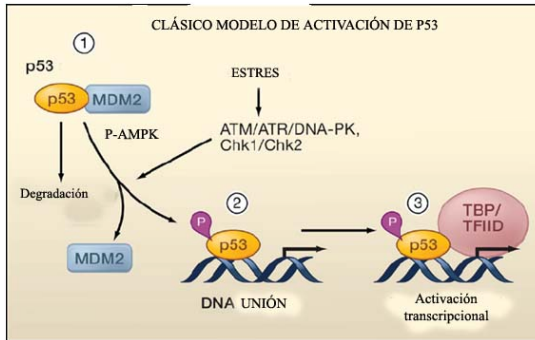
### *Regulación de actividad de p53*

La cantidad de proteína p53 en las células es determinada principalmente por la velocidad a la que se degrada, en lugar de la velocidad a la que se produce. El producto de degradación se realiza a través de un proceso conocido como proteólisis mediada por ubiquitina. A través de una serie de pasos, varias copias de un pequeño péptido (ubiquitina) están unidas a la proteína a ser degradada (en este caso p53).

Esta cadena de ubiquitina actúa como una "bandera", permitiendo que p53 pueda ser detectada por la maquinaria de proteína-degradante (Kruse JP and Gu W, 2009). La proteína MDM2 (Murine Doble Minute 2) es una de las enzimas implicadas en el etiquetado de p53 con ubiquitina. Este proceso, es un proceso de retroalimentación.

La proteína p53 se une a la región reguladora del gen MDM2 y estimula la transcripción de este gen en ARN mensajero, que luego se traduce en proteína (Figura 14). Esta proteína MDM2 se une a p53 y estimula la incorporación de grupos de la ubiquitina al carboxilo terminal de la proteína p53, que a continuación es degradado. Esto reduce la concentración de p53 y reduce la transcripción del gen de MDM2, cerrando el bucle de retroalimentación y permitiendo que los niveles de p53 aumenten de nuevo (Ito A., et al., 2001).



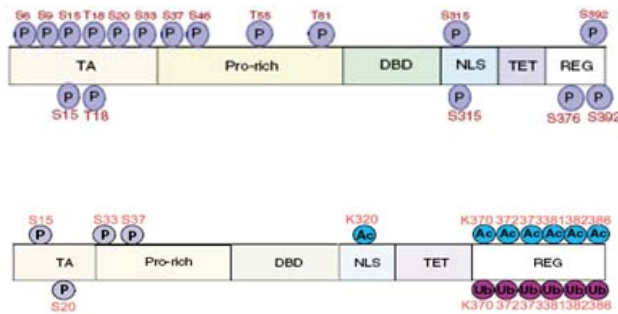


**Fig. 14:** Modelo clásico de activación de p53, en el cual se muestra su unión a MDM2 (forma inactiva), ante un estrés. Señales como la fosforilación por AMPK, pueden estabilizarlo y de esta forma separarse de MDM2 (forma activa) para unirse al ADN y activar a sus genes diana

Los mayores niveles de p53 por sí solos no son suficientes para que se convierta en un activador transcripcional. Esto requiere cambios conformacionales en la proteína, como resultado de modificaciones tales como la adición o eliminación de grupos fosfatos, acetilos, glucosilos, ribosa, ubiquitina o sumoilación ((Kruse JP and Gu W, 2009) (ver figura 15). El extremo carboxilo de la proteína p53 normalmente se dobla hacia atrás e inhibe la unión al dominio del ADN situado en la parte central de la proteína p53. La acetilación de restos de lisina o fosforilación de los residuos de serina cerca del extremo carboxilo de la proteína p53 puede mejorar la unión de p53 al ADN, presumiblemente al interferir con este plegamiento. La fosforilación del extremo amino terminal de p53 no afecta a sus capacidades de unión al ADN, pero afecta a su afinidad por la degradación de MDM2. Otros cambios en la proteína p53 y MDM2 también son importantes para p53. Cuando una proteína promueve la síntesis de su propio regulador negativo, los niveles de las dos proteínas en una célula se esperarían que oscilen. Esto se ha observado para p53 y MDM2. Del mismo modo, cualquier perturbación de p53 o MDM2 puede tener efectos dramáticos en la

## INTRODUCCION

otra, así como sobre el comportamiento de las células y de los organismos. Esto se demuestra por el hecho de que los ratones genéticamente modificados carentes de MDM2 y p53 pueden sobrevivir hasta la edad adulta, mientras que los ratones que carecen solo de MDM2 mueren como embriones, presumiblemente a causa de la elevada actividad de p53 (Rubbi and Milner, 2003).



**Fig. 15:** Sitios de fosforilación, acetilación y ubiquitinización de p53. Donde P: fosforilación; Ac, acetilación; Ub, ubiquitinización.

### *P53 y Metabolismo*

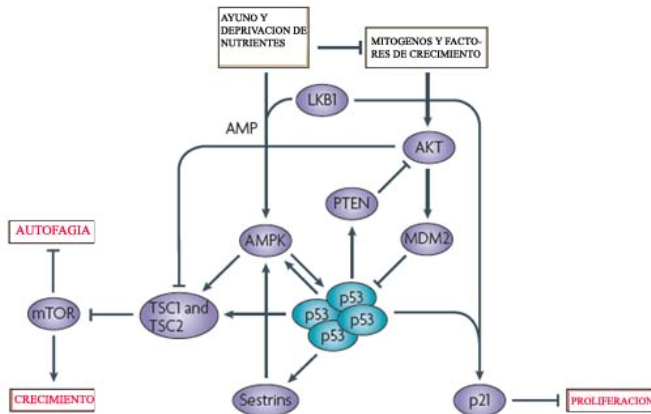
Diversos estudios han señalado cambios dramáticos en los procesos catabólicos y anabólicos en las células malignas de diversos tumores. Como ejemplo, la captación de glucosa que era mucho mayor en los tumores que en la mayoría de tejidos normales (Warburg O., 1956). Recientes hallazgos indican que p53 desempeña un papel importante en la glucólisis y la fosforilación oxidativa. El metabolismo de la glucosa es el mayor evento en el desarrollo y el mantenimiento de una variedad de cánceres humanos, como fue descrito en 1956 por Otto Warburg. La tasa o grado de

fermentación láctica anaeróbica en células cancerígenas es significativamente mayor que en las células normales. Por ejemplo la privación de oxígeno en regiones del tumor lleva al cambio a la glucólisis más que a la fosforilación oxidativa, para mantener el crecimiento tumoral (Bensaad K, 2006).

Las vías metabólicas en las células normales están estrechamente reguladas para permitir el crecimiento celular o la supervivencia, dependiendo de las condiciones. La disponibilidad de nutrientes facilita la síntesis de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos para el crecimiento y proliferación celular, mientras que la carencia de nutrientes provoca una serie de respuestas para restringir la proliferación celular, maximizar la producción de energía y ayudar a la supervivencia celular. Dentro de estos factores importantes en estas respuestas se encuentra mTOR, que promueve la síntesis de proteínas y suprime la inducción de autofagia. mTOR es regulado por Akt (proteína cinasa B) y la proteína cinasa activada por AMP (AMPK), el cual se considera como un sensor de nutrientes respondiendo a un incremento de la relación AMP/ATP bajo condiciones de baja energía para reprimir a mTOR (Feng Z., 2005) (ver figura 16).

La activación de p53 por el estrés metabólico es regulada por la fosforilación dependiente por AMPK e influenciada por mTOR. La vía de mTOR juega un papel crítico en la regulación de la proliferación celular y metabolismo celular. mTOR forma dos complejos en las células, mTORC1 y mTORC2. El estrés metabólico activa a AMPK, el cual en cambio fosforila y activa a la proteína TSC2 (tuberous sclerosis complex 2). TSC2 ejerce actividad de GTPasa para regular negativamente a la proteína de unión al GTP, Rheb, que es la proteína que activa a mTORC1, el cual a su vez puede directamente o indirectamente desfosforilar a p53 en la serina 15 en respuesta a la escasez de nutrientes (Feng Z, et al, 2006).

## INTRODUCCION



**Fig. 16:** Activación de p53 por la carencia de nutrientes a través de la activación de AMPK e inactivación de Akt. P53 induce a genes que activan a AMPK y este a su vez activa a p53, fosforilándolo, y AMPK activa a TSC1 y TSC2. Que producen la inhibición de mTOR. LKB1 también activa a AMPK.

p53 induce la expresión de un número de genes diana de la vía mTOR y IGF-1/AKT, incluyendo IGF-BP3, PTEN, TSC2, AMPK b1, Sestrinas 1 y 2. Todos los productos de estos genes regulan negativamente la vía IGF-1/Akt y mTOR en respuesta a señales del estrés. Se ha demostrado que AMPK puede ser fosforilado y activado por la unión a las sestrina 1 y 2, que son genes dianas de p53. P53 induce la expresión de las sestrinas 1 y 2, las cuales interactúan con las subunidades  $\alpha$  de AMPK resultando en la fosforilación de AMPK en la treonina 172, lo que resulta en la activación de AMPK y TSC2 y la inhibición de la vía de mTOR (Budanov AV, 2008; Feng Z, 2007).

Por otra parte, en la mayoría de células normales, la vía de los ácidos tricarboxílicos conduce a la generación de ATP en la presencia de  $O_2$  (fosforilación oxidativa, 36 ATP por moléculas de glucosa) pero en condiciones en donde existe una limitación de  $O_2$  o donde el ATP se necesita rápidamente, la glucólisis se convierte en la vía metabólica preferencial para



obtener energía, debido a que produce ATP a una mayor proporción que la fosforilación oxidativa (aunque produce 2 ATP por molécula de glucosa) (Pfeiffer T., 2001).

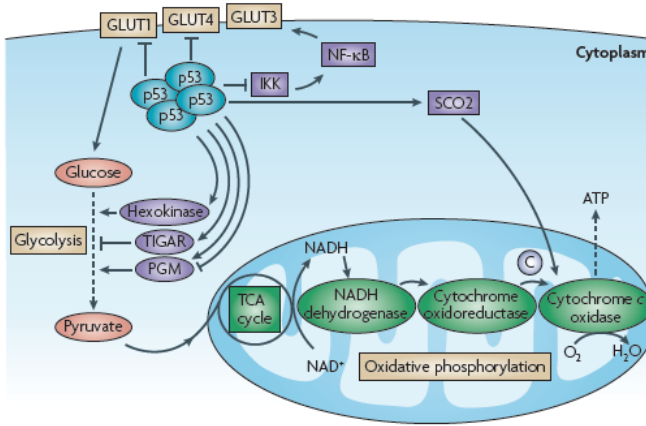
Dentro de los tumores existe con frecuencia una disminución del riego sanguíneo, y por tanto las células cancerígenas sometidas a un medio de hipoxia, utilizan preferencialmente la glucólisis. También se conoce que dentro de las células tumorales existe un incremento de los requerimientos de energía, debido a la alta proliferación celular, por lo que también necesitan macromoléculas para mantener el crecimiento tumoral, así como para sobrevivir en condiciones de estrés oxidativo e hipoxia. Se ha observado también un aumento del uso de la glutamina en las células cancerígenas proveyendo un importante mecanismo anaplerótico para el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Suzuki S., 2010). Todos estos cambios en las vías metabólicas durante la transformación maligna celular, no son producto de alguna deficiencia de las mismas, sino una adaptación o habilidad asociadas a la transformación oncogénica para promover el suministro de energía a través de la glucólisis.

Como se ha mencionado anteriormente, la reducción de nutrientes o los bajos niveles energéticos activan a AMPK, y se inhibe la vía Akt-mTOR, lo que conduce a la activación de p53. Por una parte Akt activa a MDM2, un regulador negativo de p53, y p53 puede activar a PTEN, el cual es un conocido regulador negativo de Akt. AMPK puede activar a p53 directamente, incrementando su transcripción ó estabilizando a p53 a través de la fosforilación. El ADP y ATP también modulan la capacidad de p53 para su unión con el ADN, siendo el ADP un promotor de su unión y el ATP un inhibidor de la interacción de p53 con el ADN (Feng Z., 2007). Al final todos estos procesos son un mecanismo por el cual un descenso de la energía se interpreta como una señal para la inducción y activación de p53. Al

## INTRODUCCION

mismo tiempo otros estudios han demostrado que el metabolismo de la glucosa estimulado por la expresión de GLUT1 o la hexokinasa (enzima que convierte la glucosa en glucosa 6 fosfato) suprimen la actividad de p53, demostrando de esta forma que los altos niveles de glucólisis vistos en las células cancerígenas, pueden evadir el efecto supresor de p53 (Schwartzberg-Bar-Yoseph F., 2004).

Como contrapartida, otros estudios han demostrado que p53 puede limitar el flujo glucolítico a través de diversos mecanismos, como la disminución de la expresión de receptores de glucosa, GLUT1 GLUT4, ó a través de represión génica directa, o indirectamente a través de la inhibición de NFkB (Figura 16 y 17). La regulación negativa de la fosfoglicerato mutasa por p53, también reduce la velocidad de la velocidad de la glucólisis. TIGAR (TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator) funciona como la fructosa-2-6-bifosfatasa, limitando la actividad de la fosfofructocinasa 1(PFK1) y así de esta manera disminuye la velocidad de la glucólisis y promueve el flujo de los intermediarios glucolíticos hacia la vía de las pentosas fosfato. Por otra parte se ha demostrado que la expresión basal de ChREBP (carbohydrate responsive element-binding protein) promueve la glucólisis aeróbica, manteniendo la proliferación celular y la biogénesis de lípidos y nucleótidos (Bensaad K., 2006).



**Fig. 17:** Regulación del flujo glucolítico por parte de p53 e inhibición de la expresión de transportadores de glucosa GLUT1, GLUT4. Papel de TIGAR en la regulación de p53.

También se ha demostrado que los niveles de ChREBP se encuentran elevados en células deficientes del gen p53, demostrando que los niveles basales de p53 suprimen los niveles de ChREBP (Tong X. et al, 2009). Se ha comprobado que la hipoxia tiene un efecto positivo sobre la actividad de p53, un probable mecanismo es a través del efecto negativo de la hipoxia sobre MDM2 y también por el efecto que ejerce sobre el ADN la hipoxia como un factor estresante (Tong X., 2009).

La regulación en la velocidad glucolítica por p53 es paralela a la capacidad de p53 para ayudar a mantener la fosforilación oxidativa mitocondrial. p53 induce la activación transcripcional de la subunidad I de la citocromo c oxidasa, la activación de la expresión de la síntesis de la citocromo c oxidasa 2 (SCO2), un regulador clave del complejo citocromo c oxidasa (Matoba S, 2006).

En otros experimentos, Minamino T. et al, demostraron que la inhibición de p53 en el tejido adiposo blanco disminuía significativamente los cambios

## INTRODUCCION

ligados a la senescencia, la expresión de citocinas pro-inflamatorias (TNF, CCL2), la expresión de NF- $\kappa$ B ligadas al estrés oxidativo mejoraba la resistencia a insulina y disminuía los niveles plasmáticos de insulina, demostrando que la activación de p53 en el tejido adiposo podría ser una señal pro-envejecimiento con una influencia negativa en la longevidad (Minamino T., et al, 2009).

Estos resultados fueron apoyados por experimentos recientes realizados por Shimizu et al. 2012, en el cual utilizaron un modelo de ratón con insuficiencia cardíaca, y demostraron que durante el fallo cardíaco en ratones se produce un estado inicial hiperadrenérgico lo cual promueve al aumento de la lipólisis en el tejido adiposo que incrementa la liberación de ácidos grasos. Esto conlleva al aumento de las especies reactivas del oxígeno y consecuentemente al daño del ADN y por lo tanto aumenta la expresión de p53 y la producción de citocinas proinflamatorias por medio de la vía de NF- $\kappa$ B, en el tejido adiposo, promoviendo así la resistencia a la insulina. Además, se sabe que la resistencia a la insulina contribuye a la insuficiencia cardíaca. Estos investigadores también demostraron que la delección de la expresión de p53 en el tejido adiposo, disminuía significativamente la inflamación en el tejido adiposo y las anormalidades metabólicas asociadas con la insuficiencia cardíaca (Shimizu et al. 2012)

## OBJETIVOS



OBJETIVOS

---

1. Investigar el papel de los niveles endógenos de p53 sobre la homeostasis energética y metabólica.
2. Esclarecer el papel de SIRT1 y p53 en el hipotálamo como mediador de la acción orexigénica de ghrelin.





## MATERIALES Y METODOS



## **I.-ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN**

Para realizar estos experimentos se utilizan ratas macho *Sprague-Dawley* (8 semanas de edad, 200-250 gr.; animalario general, Universidad de Santiago de Compostela) y ratones con base genética mixta C57BL/6J y 129/sv homocigotos *wildtype* (*wt*) y *Knockout* para el gen p53 (*ko* p53). Los ratones *wildtype* (*wt*) y *knockout* (*ko*) se originan de aparejamientos entre ratones heterocigotos para el gen p53 y solo las camadas de ratones *wildtype* y *knockout* se utilizan en los experimentos. En todos los casos se trata de ratas macho y ratones machos y hembras adultos.

Los animales sometidos a cirugía permanecen en el animalario durante 5-6 días antes de ser utilizados para que se adapten a las condiciones de temperatura y luz. Estas condiciones se mantienen constantes a 22-24°C e iluminación controlada en ciclos alternos de 12/12 horas luz/oscuridad. Las ratas y ratones se alimentan con pienso comercial y agua *ad libitum*. En el caso de los ratones alimentados con dieta alta en grasa (High Fat Diet HFD) estos permanecen como mínimo 12 semanas con esta dieta después de ser destetados.

En aquellos casos que es necesario realizar una cirugía en ratas, se administra via intraperitoneal una mezcla de ketamina (100 mg/kg de peso corporal)/xilazina (15 mg/kg de peso corporal) considerándose ésta una dosis adecuada para conseguir una anestesia de grado II-III durante períodos de una o dos horas, siendo la mortalidad muy baja. Los ratones se anestesian con una inyección intraperitoneal, usando como anestésico el Tribromoetanol (480 mg/kg, *Sigma Aldrich, St Louis, MO*).

## MATERIALES Y METODOS

Los animales se tratan y se sacrifican a las 17 semanas de edad, y en el caso de los ratones deficientes para el gen p53, antes de cualquier signo de morbilidad o desarrollo de tumores. Todos los protocolos de manipulación animal se han realizado cumpliendo las *Normas de Cuidado de Animales de Laboratorio y Ley Internacional de Experimentación Animal*.

### SOLUCION ANESTESICA

I.-KETAMINA: 42.5 % ketolar, parke-Davius, Morris Plańis N. J. USA, 50mg/ml

II.-XILAZINA 20% Rompun, Bayer Leverkusen, Alemania. 2 mg/ml

III.-Solución Salina Fisiológica (SSN)

### FORMULA DE DIETAS UTILIZADAS

Fórmula de Dietas utilizadas, Research diets, Inc. 20 Jules lane, New Brunswick, NJ, USA.:

**High Fat Diets:** proteínas (20 kcal%), carbohidratos (35 kcal%), grasas (45 kcal%).

**Standard Diets** (dieta control): proteínas (20 kcal%), carbohidratos (70 kcal%), grasas (10 kcal%).

## MATERIALES Y METODOS

Ingredientes	HFD gm.	HFD kcal	STD gm.	STD kcal
Caseína	200	<b>800</b>	200	<b>800</b>
L-cisteína	3	<b>12</b>	3	<b>12</b>
Almidón de maíz	72.8	<b>291</b>	315	<b>1260</b>
Maltodextrina 10	100	<b>400</b>	35	<b>140</b>
Sucrosa	172.8	<b>691</b>	350	<b>1400</b>
Celulosa	50	<b>0</b>	50	<b>0</b>
Aceite de soja	25	<b>225</b>	25	<b>225</b>
Manteca de cerdo	177.5	<b>1598</b>	20	<b>180</b>
Mezcla de minerales S10026	10	<b>0</b>	10	<b>0</b>
Fosfato dicálcico	13	<b>0</b>	13	<b>0</b>
Carbonato cálcico	5.5	<b>0</b>	5.5	<b>0</b>
Citrato potásico	16.5	<b>0</b>	16.5	<b>0</b>
Mezcla de vitaminas V10001	10	<b>40</b>	10	<b>40</b>
Bitartrato de colina	2	<b>0</b>	2	<b>0</b>

## **II.-TÈCNICAS EXPERIMENTALES**

### **CANULACIÓN INTRACEREBROVENTRICULAR (I.C.V.)**

Esta operación se realiza aproximadamente 4 días antes del experimento. El objetivo de la implantación de estas cánulas es acceder al ventrículo lateral. Se utilizan cánulas de polietileno (PE-20, PE-50, *Clay Adams*, *Becton-Dickinson*, New Jersey USA) de calibre fino (1.09 mm. de diámetro externo y 0.38 de diámetro interno) en uno de los extremos de la cánula se pone un tope y se corta en bisel a unos  $\frac{3}{4}$  mm de distancia, siendo esta parte la que se introduce en el cerebro y la que permite el acceso al ventrículo lateral. El extremo opuesto de la cánula se sella hasta el día del experimento. Una vez anestesiados los animales, (con las dosis descritas previamente), se realiza un corte en la piel de la cabeza a la altura de la frente y hasta la parte posterior de los ojos, dejando al descubierto el tejido subcutáneo, el cual debe ser retirado con la ayuda de un bisturí hasta dejar a la vista el cráneo. Se localiza el bregma, que separa los huesos frontales de los occipitales y se utiliza como punto de referencia para realizar un orificio (1.2 mm mediolateral y 1 mm posterior) a través del cual se introduce la cánula. Posteriormente se añade cianoacrilato para que la cánula quede perfectamente fija y se sella toda la zona abierta.

Para comprobar que la cánula ha quedado en posición correcta se inyecta protamina 2 %, disuelto en agua con acetato sódico, lo cual claramente tiñe el ventrículo lateral, demostrando así que la cánula ha sido colocada correctamente.

### **III.-METODOLOGIA EXPERIMENTAL**

#### **Estado nutricional**

##### ***Efecto del estado nutricional***

Se establecieron los siguientes grupos experimentales:

8 ratas con alimento *ad libitum*

8 ratas en ayuno durante 48 horas

8 ratas en ayuno durante 48 horas y realimentadas durante 24 horas

##### ***Efecto de la alimentación con dieta alta en grasas (HFD)***

Se establecieron los siguientes grupos experimentales:

8-12 ratones *wt* alimentados con dieta alta en grasas

8-12 ratones *p53 ko* alimentados con dieta alta en grasas

#### **Tratamientos intracerebroventriculares (i.c.v.)**

##### ***Efecto de ghrelin sobre la ingesta y ganancia de peso***

Administración i.c.v. de ghrelin

Se establecieron los siguientes grupos experimentales:

8 ratas control (5 ul solución salina normal, SSN)

8 ratas tratadas con ghrelin (5 ug/5 ul)

Ghrelin (ghrelin human trifluoroacetate; ref: H4864; Bachem)

##### ***Efecto del inhibidor de SIRT1 sobre la acción de ghrelin***

Administración i.c.v. de EX527 y ghrelin

Se establecieron los siguientes grupos experimentales:

8 ratas control (5 ul DMSO + 5 ul SSN)

8 ratas tratadas con ghrelin (5ug/5 ul SSN)

## MATERIALES Y METODOS

8 ratas tratadas con EX527 (10 ug/5 ul DMSO)

8 ratas tratadas con EX527 (10 ug/5 ul ) + ghrelin (5ug/5 ul)

Ghrelin (ghrelin human trifluoroacetate; ref: H4864; Bachem)

EX527 (6-Chloro-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazole-1-carboxamide, 10 mg,

TOCRIS bioscience)

El mismo procedimiento se utilizó para la administración de Sirtinol 10 µg i.c.v.  
(Tocris Bioscience, USA)

### ***Efecto de la administración de Resveratrol sobre la ingesta***

Administración de resveratrol (10 ug/2 ul) i.c.v.

Se establecieron los siguientes grupos experimentales:

8 ratones wt control (2 ul DMSO)

8 ratones wt Resveratrol (2 ul Resveratrol )

8 ratones *p53 ko* control (2 ul DMSO)

8 ratones *p53 ko* Resveratrol (2 ul)

Resveratrol (Tocris Bioscience, USA, 1418)

### ***Efecto de la administración de AICAR***

Administración de AICAR (3 ug/5 uL) i.c.v.

Se establecieron los siguientes grupos experimentales:

8-12 ratones C5/BL6 *p53 ko* (2 ul SSN)

8-12 ratones C5/BL6 *p53 ko AICAR* (3 ug/5 uL; Sigma-Aldrich, A9978)



#### **IV.-PROTOCOLO EXPERIMENTAL**

##### **GASTO ENERGETICO, ACTIVIDAD LOCOMOTORA, COCIENTE RESPIRATORIO**

Se analizó el gasto energético, cociente respiratorio RQ y actividad locomotora usando un sistema calorimétrico de 12 cajas (*PhenoMaster, Sophisticated Life Science Research Instrumentation, TSE system, Germany*). Los ratones fueron colocados en cajas individuales durante 48 horas para su adaptación, posteriormente se colocan en el sistema durante 48 horas, durante los que se recolectan los datos y posteriormente se analizan. Se utilizaron 12 individuos por grupo.

##### **TEST DE TOLERANCIA A LA INSULINA**

El test es realizado en ratones adultos con más de 12 semanas de edad, se realiza por la mañana en ratones en ayuno nocturno, se inyecta la insulina (0.75 U/kg) disuelta en SSN de manera intraperitoneal. Previo a la inyección de insulina, se recolecta sangre de la vena de la cola, para medir los niveles de glucosa basal, luego se inyecta la insulina intraperitoneal y se mide la glucosa a los 15, 30, 60, 90, 120 minutos, mediante un glucómetro.

##### **Material**

- Glucómetro y tiras de glucosa
- Jeringas 1 ml x 27s ga.
- Insulin Human, recombinant 50 MG (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)

## MATERIALES Y METODOS

### Preparación previa al test de insulina

Se pesan los animales previamente al test. Se colocan los animales en cajas individuales con bebida *ad libitum*.

### **TEST DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA**

Dosis: 2 gr/kg de peso corporal

#### Material

- Glucómetro y tiras de glucosa
- Jeringas 1ml x 39s ga.
- D-Glucosa (Sigma Aldrich)

#### Preparación previa al test de glucosa

Se pesan los animales previamente al test. Se colocan los animales en cajas individuales con bebida *ad libitum*.

Previo a la inyección de la glucosa intraperitoneal, se recolecta sangre de la vena de la cola, para medir los niveles de glucosa basal, luego se inyecta la glucosa vía intraperitoneal y se miden los niveles de glucosa a los 15, 30, 60 90, 120 minutos.

## **V.-METODOLOGIA ANALITICA**

### **WESTERN BLOTTING**

#### ***Extracción de proteínas***

##### ***Homogenización y preparación de tejidos para Western blotting***

Se utilizaron 8 individuos por cada grupo experimental.

Las muestras se mantienen a -80°C, en el momento que se procesan las muestras se mantienen en hielo. Se les añade tampón de lisis en proporción al tejido que en este caso son 1000 µl para grasas e hígado, 500 ul para hipotálamo de rata y 160 ul para hipotálamo de ratón.

Se utiliza el siguiente tampón de lisis:

#### **TAMPON DE LISIS**

Tris-HCl\* pH: 7.5

EGTA 0.2 M\* (pH 8)

EDTA 0.2 M\* (pH 8)

Tritón-X 100\*

Sodium Orthovanadate\* 0.1 M

Sodium Fluoride\*

Sodium Pyrophosphate\*

Sucrosa\* 0.27 M

(\*)Sigma Aldrich, St. Louis, USA

Se utiliza el inhibidor de proteasas “Complete, proteasa inhibitor cocktail tablets” (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA) 1 tableta por cada 50 ul de tampón de lisis.

## MATERIALES Y METODOS

Se homogenizan los hipotálamos en el homogenizador “Tissue lyser II” (Qiagen, Retsch, Germany) y se centrifuga por 30 minutos a 13,200 RPM a 4°C. A continuación se determina la concentración de proteínas a través del método colorimétrico Bradford ((Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, Germany) en el espectrofotómetro *Sunrise* (Tecan, Austria).

Se les añade el tampón de carga a las muestras y se guardan a -80°C hasta ser utilizadas.

Para la preparación del Tampón de carga:

### **“SAMPLE BUFFER” 5 x (Tampón de carga)**

250 mM Tris-HCl pH: 6.8

10% (w/v) SDS (sodium dodecyl sulfate)

50% (v/v) Glicerol

0.0005 % (w/v) Bromophenol Blue

5% (v/v)  $\beta$ -mercaptoetanol

Al momento de utilizar las muestras se colocan en hielo y luego se calientan a 95°C durante 10 minutos.

### ***Electroforesis y transferencia***

Se separan las proteínas por su peso a través de la utilización de geles de poliacrilamida SDS-PAGE del 6%, 8% y del 10%, estos geles constan de dos fases, “*Stacking gel*” y “*Running gel*”, los cuales sirven primero para apilar las proteínas y luego separarlas según tamaño, “(preparados según Molecular cloning, A laboratory manual, Maniatis, 2ª edición) se cargan 20  $\mu$ g en el caso de la grasa e hígado y 40  $\mu$ g de proteínas en 16  $\mu$ l en el caso del hipotálamo. La

electroforesis se realiza a 130 V durante 100 minutos en caso de geles al 6% ó a 100 Voltios durante 100 minutos en caso de geles al 10 %.

Se utilizan los siguientes tampones:

Tampón de electroforesis (Running Buffer) 5 X: 72 gr de Glicina, 15 gr de Tris-base, 5 gr de SDS

Tampón de transferencia 25 X: 36.5 gr. de Glicina, 72.5 gr de Tris-base, 4.5 gr. de SDS

Luego se realiza la transferencia de los geles a membranas PVDF (fluoruro de polivinilideno, 0.45 um, Millipore, Massachusetts, USA). Las transferencias se realizan a 0.18 A durante 100 minutos. Las membranas de PVDF se activan previamente en metanol 5 minutos, agua 2 minutos y tampón de transferencia 2 minutos.

Se bloquean las membranas con BSA (Bovine albumin, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) y con leche desnatada (Nonfat-dried Milk Bovine, sigma Aldrich, St. Louis, USA) durante una hora o 24 horas según el anticuerpo temperatura ambiente o a 4°C, según especificaciones de cada anticuerpo.

### **Inmunodetección**

Las membranas se lavan en TBS-TWEEN (100 ml-TBS 10 x, 1 ml-TWEEN 20, 900 ml agua destilada) y luego se incuban las membranas con el anticuerpo primario a las diluciones adecuadas, durante una hora a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4° C.

Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios a una dilución de 1:10000 y se incubaron durante una hora o durante toda la noche:

## MATERIALES Y METODOS

ACC (anti-acetyl CoA Carboxylase) pACC $\alpha$ (anti-phospho-acetyl-CoA Carboxylase, ser 79) AMPK $\alpha$ 1 (AMP-activated protein kinase $\alpha$ 1) AMPK $\alpha$ 2 (AMP-activated protein kinase $\alpha$ 2)	Upstate, Millipore, Temecula, CA, USA
pAMPK $\alpha$ -Thr <sup>172</sup> (phospho-AMP-activated protein kinase) acetyl -p53 (Lys379) Phospho-CREB (Ser13) CPT1 (carnitin palmitoyl transferase 1) FAS (fatty acid synthase) LPL (lipoprotein lipase) PGC1 (PPAR gamma coactivator 1 alpha) JNK (c-Jun kinase enzyme)	Cell Signaling, Danvers, USA.
SIRT1 (sirtuina 1) FKHR (C-15)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany
$\beta$ -Actina	sigma Aldrich
UCP-1 (Uncoupling protein 1)	Abcam, cambridge, uk

Se realizan tres lavados con solución TBS-TWEEN de 5 minutos cada uno y luego se incuba con el anticuerpo secundario durante una hora a temperatura ambiente.

Como anticuerpos secundarios se utilizan, con una dilución de 1:50000, y se incuban por una hora:

Polyclonal Goat Anti-Rabbit immunoglobulins/HRP

Polyclonal rabbit Anti-Mouse immunoglobulins/Mouse HRP (Dako, Dinamarca)

-Se incuba la membrana durante 1-2 minutos con el sustrato y potenciador de quimioluminiscencia a volúmenes iguales (1ml de cada), en oscuridad y sin agitación.

**\*\*Para detectar la proteína usamos anticuerpo secundario conjugado con HRP y quimioluminiscencia.**

**\*\*Sustrato de Quimioluminiscencia: Pierce® ECL Wb substrate (Thermo scientific)**

Cuando el anticuerpo secundario se incuba con el sustrato y el potenciador emite una reacción luminosa que permite la visualización, mediante autorradiografía, de la interacción de los anticuerpos con la proteína de la muestra.

Se coloca la membrana en un cassette de autorradiografía con películas fotográficas (Amersham, Hiperfilm M RPN 6K) y se revelan las películas a distintos tiempos en función de la señal obtenida.

### **RT-PCR:**

#### **EXTRACCION DE ARN TOTAL**

##### **a) Extracción de ARN de los tejidos**

Las muestras congeladas se homogenizan mecánicamente (Polytron) después de añadirle una cantidad determinada de Trizol (Invitrogen): 400 µl en el caso del hígado, y 500 µl en el caso de la grasa.

Después de la homogeneización las muestra se dejan reposar a T<sup>a</sup> ambiente durante unos 5 minutos

##### **b) Aislamiento de ARN**

A continuación se añade 1 ml de cloroformo y se agita fuertemente durante varios segundos, y luego se dejan reposar durante unos minutos. Transcurrido ese tiempo se centrifuga 15 minutos a 12000 rpm a 4°C observando ya claramente las 2 fases: una fase acuosa (donde se halla el ARN) y una fase fenólica (que contiene las proteínas y los lípidos), entre ambas se encuentra la interfase (donde está el ADN). Se retira la fase acuosa con cuidado pasándola a otro tubo de polipropileno autoclavado y se desprecia la fase fenólica. De esa manera separamos el ARN del resto de los componentes celulares.

##### **c) Precipitación de ARN**

Una vez separado el RNA, se le añade 1 ml de isopropanol, se agita y se deja a -20°C durante unos 10 minutos, consiguiendo así que el ARN precipite. Transcurrido este tiempo se centrifuga 10 minutos a 12000 rpm a 4°C para concentrar el ARN al fondo.



### **d) Lavado**

Una vez eliminado el sobrenadante se añade 1 ml de etanol al 70% en H<sub>2</sub>O DEPC, y tras una agitación corta se centrifuga durante unos 5 minutos a 12000 rpm y 4°C.

Para eliminar la mayor cantidad de etanol posible, se vuelve a centrifugar 1 minuto a 13500 rpm y 4°C, y posteriormente se retira el sobrenadante con una pipeta. Finalmente se resuspende en H<sub>2</sub>O DEPC calentándolo a 60 °C durante 15 minutos.

### **Cuantificación**

La concentración de ARN de la muestra se determina en un espectrofotómetro ajustado a 2 longitudes de onda: 260 y 280 nm. La absorción a 260 nm proporciona la cantidad de ácidos nucleicos y a 280 nm la cantidad de proteína. El grado de pureza de la muestra se determina estudiando el cociente 260/280, considerándose aceptable la oscilación entre 1.8 y 2.

**\*\*TRIZOL® Reagent (Invitrogen)**

**\*\*Cloroformo**

**\*\*Isopropanol**

**\*\*Etanol 70%**

**\*\*H<sub>2</sub>O DEPC:** agua bidestilada con dietilpirocarbonato al 0.1%. Tras una noche a T<sup>a</sup> ambiente se autoclava.

### RETROTRANSCRIPCIÓN (RT)

La reacción de retrotranscripción se lleva a cabo en un volumen total de 30 µl, con las siguientes proporciones:

- Volumen de muestra necesario para obtener: 500 ng de (grasa) ó 100 ng (hígado) de ARN total
- 6 µl de tampón de reversotranscripción (5X first strand buffer; Invitrogen) (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>, 50nM DDT)
- 1.5 µl ClMg<sub>2</sub> de 50 mM (Invitrogen)
- 6 µl de mezcla de dNTPs (dTTP, dCTP, dGTP, dATP, con una concentración de 10 mM de cada uno
- 0.17 µl de cebadores (Random primers, Invitrogen)
- 0.25 µl inhibidor de RNasa(RNaseOUT®, 40 U/ µl Invitrogen)
- 2 µl de m-MLV reversotranscriptasa (200 U/ µl, Invitrogen)
- Volumen correspondiente de H<sub>2</sub>O MQ para obtener el volumen final de 30 µl

También se realiza una RT (30 µl de mezcla de reacción excepto mMLV, cuyo volumen era sustituido por H<sub>2</sub>O MQ)

Una vez preparadas las mezclas de reacción, se incuban en un termociclador, que realiza los siguientes pasos: 50 minutos a 37°C, 15 minutos a 42°C, 5 minutos a 95°C, y finalmente las muestras se mantenían a 4°C.

### PCR Tiempo Real (TAQMAN)

Se usa como sistema de detección las Sondas Taqman (Sondas específicas marcadas con fluorocromos: donador y aceptor). Está basado en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) entre las dos moléculas.

El fluorocromo utilizado para la realización de la PCR ha sido TAMRA que posee un máximo de absorción de 560nm y un máximo de emisión de 580nm. Los primers usados fueron diseñados según la base de datos BLAST. La mezcla de reacción de PCR cuyo volumen final era de 12 µl estaba constituida por:

- 2.92 µl H<sub>2</sub>O-MQ
- 0.36 µl Oligonucleótido sentido (10 µM)
- 0.36 µl Oligonucleótido antisentido (10 µM)
- 0.36 µl Sonda (5 µM)
- 6 µl Taqman Universal PCR master mix; (Applied Biosystems)
- 2 µl Muestra (RT)

Además de las muestras, se añade un control negativo (-RT), un blanco y 6 muestras para la realización de una curva patrón tanto para el gen problema como para el housekeeping o gen constitutivo, todo ello por duplicado.

**\*\*Curva patrón:** consta de 6 puntos realizados por dilución seriada (1:4) a partir de un volumen total de 30-40 µl resultante de la mezcla de distintas muestras de RT (2 µl de distintos productos de RT, pero siempre del mismo tratamiento o tejido).

Las condiciones de amplificación fueron de:

- 1) 50°C durante 2 minutos
- 2) 95°C durante 10 minutos,
- 3) 95 ° durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. Número de ciclos: 40

Para llevar a cabo la reacción de PCR se utiliza 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) mediante el programa informático 7300 System Software® (Applied Biosystems). El análisis de los datos se realiza en base a un

## MATERIALES Y METODOS

gen de referencia, en este caso el 18S, en concreto calculando la diferencia entre eficiencias de ambos genes:

Referencia y problema.

### **mRNA Secuencia**

**Sonda** FAM-5'-ACCTTTGAAGATTTTCGTCAGGATCTTTGATGA-3'-

TAMRA

**ACCα Pimer forward** 5'-TGGGCGGGATGGTCTCTTT -3'

**Primer reverse** 5'-AGTCGCAGAAGCAGCCCAT-3'

**Sonda** FAM-5'-CTGCCCAGGACAGGAACCG-3'-TAMRA

**FAS Pimer forward** 5'-GACATTTTCATCAGGCCACC-3'

**Primer reverse** 5'-CCTCTAGCAGCCGCACCTC-3'

**Sonda** FAM-5'-CCTGCCGGAGGTCGCCACAAATA-3'-TAMRA

**LPL Pimer forward** 5'-CTGAAAGTGAGAACATTCCCTTCA-3'

**Primer reverse** 5'-CCGTGTAAATCAAGAAGGAGTAGGTT-3'

**Sonda** FAM-5'-TCACCTTGAGAGAAGAATTAGCACGCACGG-3'-TAMRA

**SCD-1 Pimer forward** 5'-TGCCAGAGGGAATAGGGAAA-3'

**Primer reverse** 5'-CTCTCCCATCCTTACTTACAAACCA-3'

**Sonda** FAM-5'-TGGTCAAGGAGCTGCAGAAGGAGTTTCCT -3'-TAMRA

**MCD Pimer forward** 5'-CGGCACCTTCCTCATAAAGC -3'

**Primer reverse** 5'-TGGAAAAGGCCCCCAGAT -3'

### **CPTM Comercial**

**Sonda** FAM-5'-CGCTGTTGTGCGGCTTATTGTATCCCTTGT -3'-TAMRA

**INSIG Pimer forward** 5'-TGCTGTGGCACGGCAG -3'

**Primer reverse** 5'-CTCCCAGGTGACTGTCA -3'

**Sonda** FAM-5'-CCCTGGCCTATTTGATGCC-3'-TAMRA

**SREBP 1-c Pimer forward** 5'-CTCATCAACAACCAAGACAG-3'

**Primer reverse 5'-CCTGTCTCACCCCCAGCAT-3'**

**Sonda FAM-5'-GACGGCAAGTCTGGTGCCAGCA-3'-TAMRA**

**18S Pimer forward 5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3'**

**Primer reverse 5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'**

### **HIBRIDACIÓN *IN SITU***

La expresión génica de los neuropéptidos hipotalámicos AgRP, NPY así como el factor de transcripción Bsx, se estudió por hibridación *in situ*. Dado que los péptidos estudiados se expresan en más de un núcleo hipotalámico, esta técnica nos ha permitido delimitar, anatómicamente los posibles cambios de expresión del ARNm.

Para llevar a cabo este estudio se utilizaron como sondas oligonucleótidos monocatenarios antisentido, marcadas en 3' con [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S] dNTP, todas ellas diseñadas en nuestro laboratorio. (Tabla 3)

#### **a) Obtención de los cortes**

Los cerebros de rata que se almacenan a -80°C hasta su utilización, se cortan en un criostato (*HM50E®*, *Microm*) en secciones de 16µm de espesor. Los cortes se montan en portaobjetos recubiertos de polilisina (*Polysine<sup>TM</sup>*; *VWR*)

Los portaobjetos con las secciones de interés son elegidos en función de los criterios estereotáxicos del “Atlas de cerebro de rata” de *Paxinos & Watson*. Así para el estudio de AgRP, NPY y Bsx, los cortes debían incluir el núcleo arcuato hipotalámico.

#### **Marcaje de la sonda**

La reacción de marcaje tiene lugar en un volumen final de 20µl. El orden de los reactivos es el que sigue:

- 10,5µl H<sub>2</sub>O DEPC
- 2 µl de 10X NE Buffer 4 (1X NEBuffer 4 contiene: 50mM acetato potásico, 20mM Tris-acetato, 10mM acetato magnésico, 1mM DTT; pH 7.9) (*BioLabs®*)
- 2 µl de Oligonucleótidos (100 ng; la concentración de trabajo final es 50ng/ µl)
- 2 µl de solución 10X de CoCl<sub>2</sub> (2.5mM) (*BioLabs®*)
- 1.5 µl de la enzima Terminal Transferasa (Tdt) suministrada en 60mM KPO<sub>4</sub> (pH 7.2), 150 mM KCl, 1mM 2-mercaptoetanol, 0.5% Triton X-100 y 50% glicerol. (*BioLabs®*)
- 2 µl dNTP-S<sup>35</sup> (*PerkinElmer®*)

La incubación se lleva a cabo en un baño a 37°C durante 120-150 minutos. Una vez concluida la reacción, es necesario separar los oligonucleótidos marcados de los dNTP-S<sup>35</sup> no unidos. La separación tiene lugar por cromatografía de exclusión. Se utilizan columnas de cromatografía comerciales con Sephadex G-50 (*Illustra™ NICK Columns. GE Healthcare*). El tampón que se utiliza para eluir la columna es TE (10mM Tris-HCl / 0.1mM EDTA; pH 8). Primeramente se lavan las columnas con dicho tampón, para a continuación eluir dos fracciones en 400µl de TE. La última de las fracciones se corresponde con el oligonucleótido marcado. Finalmente procedemos a determinar el número de cuentas radiactivas en un contador β (*WinSpectral 1414®*,

*Wallac*), diluyendo para ello 4µl del oligo marcado en 4ml de líquido de centelleo.

### **b) Preparación del tejido**

Los cortes son secados rápidamente con el objeto de eliminar los posibles restos de hielo seco, y a continuación se fijan en paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0.2M, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para eliminar los restos de paraformaldehído se hacen dos lavados rápidos con PBS 1X. Posteriormente, se procede a la deshidratación de los cortes mediante lavados sucesivos en diferentes concentraciones de etanol (*Guinama*) (70, 80, 90, 95 y 100%, 5 minutos cada uno, a excepción del lavado en etanol absoluto, que fue de 10 minutos). Por último se dejan secar los cortes al aire libre.

### **c) Hibridación**

Sobre cada porta se aplican 200 µl de la solución de Hibridación, con  $0.5 \times 10^6$  o  $1 \times 10^6$  cpm según el oligonucleótido marcado que estuviésemos empleando en cada caso (Tabla 4). Dicha solución, está constituida además de los oligos marcados por Buffer de Hibridación y DTT 1M.

El Buffer de Hibridación contiene H<sub>2</sub>O DEPC, SSC 4X (a partir de SSC20X: 3M NaCl; 300mM Citrato Sódico Tribásico Hidratado; *Sigma*), 10% Dextran sulfato (*Sigma*), disolución Denhart's 1X (albúmina de suero bovino-BSA, 1% Ficoll, 1%



Polivinilpirrolidona-PVP; *Sigma*), ADN de esperma de Salmón (*Sigma*), 50% formamida desionizada (*Sigma*).

Los portaobjetos con la sonda se hibridaron toda la noche a 37 °C en atmósfera húmeda.

#### **d) Lavados**

- Eliminamos el exceso de sonda y a continuación realizamos 5-6 lavados rápidos en SSC 1X
- Posteriormente lavamos 4 veces con SSC 1X a 42°C o 55°C durante 30 minutos cada lavado. (Tabla 4)
- Un lavado de 1 hora a temperatura ambiente en SSC 1X
- Lavado rápido con H<sub>2</sub>O *milliQ* autoclavada
- Precipitamos las sales con un lavado rápido en etanol 70% con 300mM NH<sub>4</sub>AC
- Lavamos con etanol absoluto y dejamos secar los cortes

#### **e) Exposición y revelado**

Una vez secos los portas, se exponen a una película de autorradiografía (*Kodak Biomax MR Film*) en condiciones de total oscuridad (*Hypercassette™ Amersham Biosciences*). En cada película son expuestas secciones representantes de cada grupo experimental. Los tiempos de exposición son distintos según el oligonucleótido estudiado. (Tabla 4). Transcurrido el tiempo de exposición las placas son reveladas en condiciones de oscuridad durante 2.5 minutos y posteriormente fijadas durante 5 minutos.

**f) Cuantificación**

Las autorradiografías se escanean utilizando el programa informático *Adobe Photoshop 7.0*. Las densidades ópticas integradas en el núcleo arcuato o ventromedial, se miden mediante el programa *Image J 1.40g*. El valor de cada uno de los puntos fue corregido por su fondo adyacente. Las áreas de medición (señal positiva y fondo) fueron idénticas en todos los casos. Los valores se convierten en porcentajes respecto al control (100%).

**Tabla 3. Condiciones de hibridación, lavados y exposición.**

ARNm	Cpm ( $10^6$ )	T° de lavado (°C)	Tiempo de exposición (días)
AgRP	0.5	55	4-5
Bsx	0.5	37	21
NPY	1	42	4-5

**Tabla 4. Secuencias de los oligonucleótidos empleados para la Hibridación *in situ***

ARNm	“GenBank” accession number	Secuencia
AgRP	AF206017	5’- CGACGCGGAGAACGAGACTCGCGGT TCTGTGGATCTAGCAC CTCTGCC-3’
Bsx	XM_001064837	5’-CCT CAACGGCTTGGGCTTGTGTAGCAGAA TGTCC-3’
NPY	M20373	5’AGATGAGATGTGGGGGGAACTAG GAAAAGTCAGGAGAGCAA GTTTCATT-3’

## **OIL RED STAINING**

Fijación: 10% formalina

Cortes: cortes a 5-10  $\mu\text{m}$  de grosor

Soluciones y reactivos

### **0.5% Oil Red O Solución:**

Oil Red O ----- 0.5 g  
Propilenglicol, 100% ----- 100 ml

Se agregan pequeñas cantidades de propilenglicol al Oil Red, con una barra de agitación. Gradualmente se añade el resto del propilenglicol, mientras se agita. Calentar ligeramente hasta que la solución alcanza el 95-100 °C. No se permite que la temperatura supere los 110 °C. El recalentamiento puede resultar en manchas de fondo. Se filtra la solución a través de papel filtro grueso (25  $\mu\text{m}$  papel de filtro), mientras se calienta todavía. Se deja en reposo durante la noche a temperatura ambiente. Si se forma un precipitado en la solución se puede filtrar de nuevo.

### **Solución de 85% Propilenglicol**

Propilen glicol, 100% ----- 85 ml  
Agua destilada ----- 15 ml

Solución de Gill o Hematoxilina de Mayer

### **Procedimiento:**

1. Se cortan secciones frescas de tejido congelado a 5-10  $\mu\text{m}$  de grosor y se montan en los portaobjetos.
2. Se dejan secar los portaobjetos por 30-60 minutos a temperatura y luego se fijan en hielo con formalina 10% por 5-10 minutos. Se dejan secar de

nuevo por otros 30-60 minutos o se lavan inmediatamente por tres veces con agua destilada.

3. Se dejan secar los portaobjetos por unos minutos.
4. Se colocan en propilenglicol absoluto por 2-5 minutos evitando llevar agua hacia el oil red O.
5. Se tiñen con la solución Oil red O precalentada por unos 8-10 minutos a 60°C
6. Se diferencian en propilenglicol al 85% por 2-5 minutos.
7. Se lavan con agua destilada 2 veces.
8. Se tiñen con tinción de Gill o hematoxilina de Mayer por 30 segundos.
9. Se lavan a fondo por 3 minutos con agua destilada.
10. Se colocan los portaobjetos en agua.
11. Se montan con glicerina u otro medio acuoso.

Resultados esperados:

Lípidos ----- rojo  
Núcleo ----- azul pálido

### **TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA**

En esta técnica utilizamos dos colorantes, la Hematoxilina y la Eosina:

Hematoxilina: es un colorante que tiene afinidad por las cargas negativas en los tejidos como los ácidos nucleicos presentes en el núcleo y otras proteínas citoplasmáticas tiñéndolas de color morado (al virar cambia a azul), pero tiñendo mucho más fuertemente el núcleo.

Eosina: es un colorante que tiene afinidad por las cargas positivas presentes en el tejido como la mayoría de las proteínas citoplasmáticas tiñéndolas de un color rojo o rosado muy fuerte.

## MATERIALES Y METODOS

**1.-Se desparafina el tejido y se hidrata como se describe a continuación:**

- Xilol I x 5 mins
- Xilol II x 5 mins
- Xilol III x 5 mins
- Alcohol 100% I x 5 mins
- Alcohol 100% II x 5 mins
- Alcohol 95% I x 5 mins
- Alcohol 95% II x 5 mins
- Alcohol 70% x 5 mins
- Agua corriente x 5 mins
- Agua destilada

**2.-Se sumerge en hematoxilina por 2 minutos y se lava:**

- Hematoxilina de Harris x 2 mins
- Agua corriente x 5 mins
- Agua destilada x Lavados
- Carbonato de Litio x Inmersiones
- Agua corriente x 5 mins

**3.-Se sumerge la placa en Eosina:**

- Eosina x 20 seg
- Agua corriente

**4.-Luego se comienza la deshidratación en alcoholes ascendentes y xiloles y luego se monta la placa.**

- Alcohol 70% x 10 segs
- Alcohol 95% I x 3 mins
- Alcohol 95% II x 3 mins
- Alcohol 100% I x 3 mins
- Alcohol 100% III x 3 mins
- Xilol I x 3 mins
- Xilol II x 3 mins
- Xilol III x 3 mins

**4.-Montar en resina sintética**

**CUANTIFICACION TISULAR DE TRIACILGLICEROL (TAG) Y ACIDOS GRASOS LIBRES.**

Se necesita aproximadamente 100 mg de tejido (hígado de ratón). A esta cantidad de tejido se le agrega 1 ml de cloroformo/metanol (2:1 vol/vol) y se homogeniza fuertemente. Se extraen los TAG en 1-3 horas de rotación o mezclando suavemente a temperatura ambiente. Luego se agregan 0.3 ml de agua miliQ para la fase de separación. Se centrifugan las muestras durante 20 minutos a 2000 rpm a temperatura ambiente y luego se remueve la capa superior inorgánica y se transfiere el precipitado orgánico a un nuevo vial usando una pipeta Pasteur. Se seca el precipitado orgánico en un SpeedVacPlus (SC210A, Savant instrument, Farmingdale, NY) toda la noche. Luego se redisuelven los TAG en 0.8 ml de cloroformo y se agita fuertemente. Finalmente se mide el contenido de TAG utilizando un método enzimático colorimétrico (sigma Aldrich, USA) o el contenido de ácidos grasos libres FFA (Dako, USA).

### **Análisis estadístico**

Los resultados en todos los casos se presentan como la Media  $\pm$  SEM (*Standard Error of the Mean*) de al menos 6-8 individuos por cada grupo experimental. Los datos se analizan mediante *ANOVA*, seguido de un test *post hoc* de *Tukey-Kramer* siempre que las variables cumplieren los requisitos de normalidad (test de *Kolmogorov-Smirnov*). Cuando las variables no cumplen alguna de las condiciones se utiliza el test no paramétrico de comparación múltiple de *Kruskal-Wallis*. Para análisis parciales entre dos grupos experimentales se emplea el test *t-student* siempre que sea posible, y en su defecto el test no paramétrico *Mann-Whitney*. Los análisis estadísticos se realizan utilizando el programa informático *GraphPad Instant 3.05*. En todos los casos, se considera una diferencia estadísticamente significativa a partir de la probabilidad  $p < 0.05$ .



## RESULTADOS



RESULTADOS

---

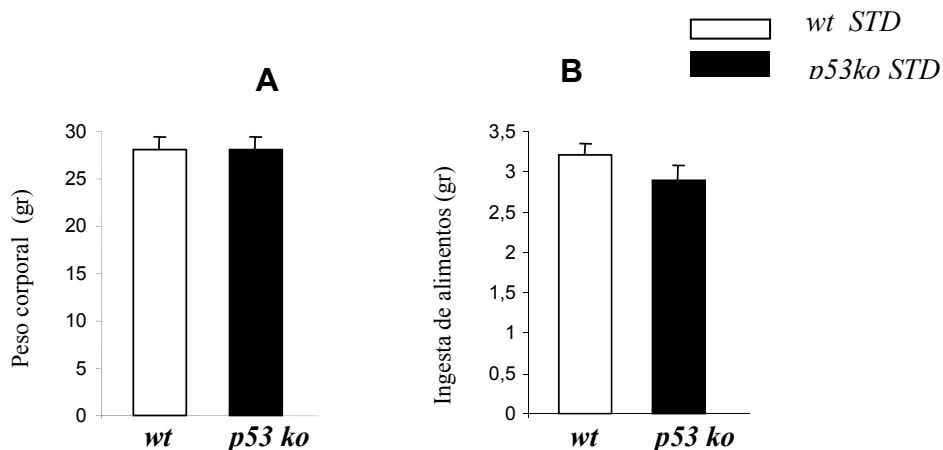
Es bien conocido el papel que el gen supresor de tumores p53 desempeña como regulador de los cambios celulares durante el desarrollo y progresión de tumores. Sin embargo p53 posee también la capacidad de mediar cambios metabólicos en las células a través de la regulación del metabolismo energético y el estrés oxidativo.

Con la relación que se estableció años atrás de p53 y la glicólisis, esta área ha ganado interés científico y recientes estudios han demostrado la capacidad de p53 de regular la expresión de diferentes enzimas involucradas en la glucólisis así como en la fosforilación oxidativa (Kondoh H, 2005; Schwartzenberg-Bar-Yoseph F., 2004; Bensaad K, 2006).

**La dieta estándar no modifica las características fenotípicas de los ratones *p53 ko* en relación a sus controles.**

En un experimento inicial partimos de camadas de ratones machos homocigotos *wildtype* (*wt*) y *p53 knockout* (*p53 ko*) los cuales fueron alimentados con una dieta estándar (4 kcal% grasas, Dieta AO4/AO4C/RO4, *Scientific Animal food & Engineering, SAFE, Francia*) durante 12 semanas posterior a su destete. Los animales se estabularon en cajas individuales con agua y comida *ab libitum* y se monitorizó el peso e ingesta semanales durante las 12 semanas.

## RESULTADOS



**Fig. 1:** Peso (A) e ingesta diaria (B) de ratones *wildtype* y *p53 knockout*, alimentados con dieta estándar (STD) *ad libitum* durante 12 semanas posterior a su destete. (n=12/grupo).

Como podemos observar, nuestros resultados demuestran que no existen diferencias estadísticas significativas en cuanto a peso (Figura 1A) e ingesta (Figura 1B) en los ratones *p53 ko* comparados con los ratones *wt*, alimentados *ad libitum* con un dieta estándar durante 12 semanas posterior a su destete.

*La dieta estándar no altera la composición corporal, ni el gasto energético en los ratones p53 ko.*

Nuestro siguiente experimento fue evaluar la posible ganancia neta de masa grasa y no grasa entre estos dos grupos experimentales, a través de resonancia magnética nuclear (RMN, Whole Body Composition Analyzer EchoMRI, General Electric Equipments, Houston, USA). Luego valoramos el gasto energético y la actividad locomotora, por calorimetría indirecta, a través de un sistema calorimétrico de 12 cajas (PhenoMaster, Sophisticated Life Science Research Instrumentation, TSE system, Germany). Los ratones fueron puestos previamente en cajas de adaptación durante 48 horas con agua y dieta

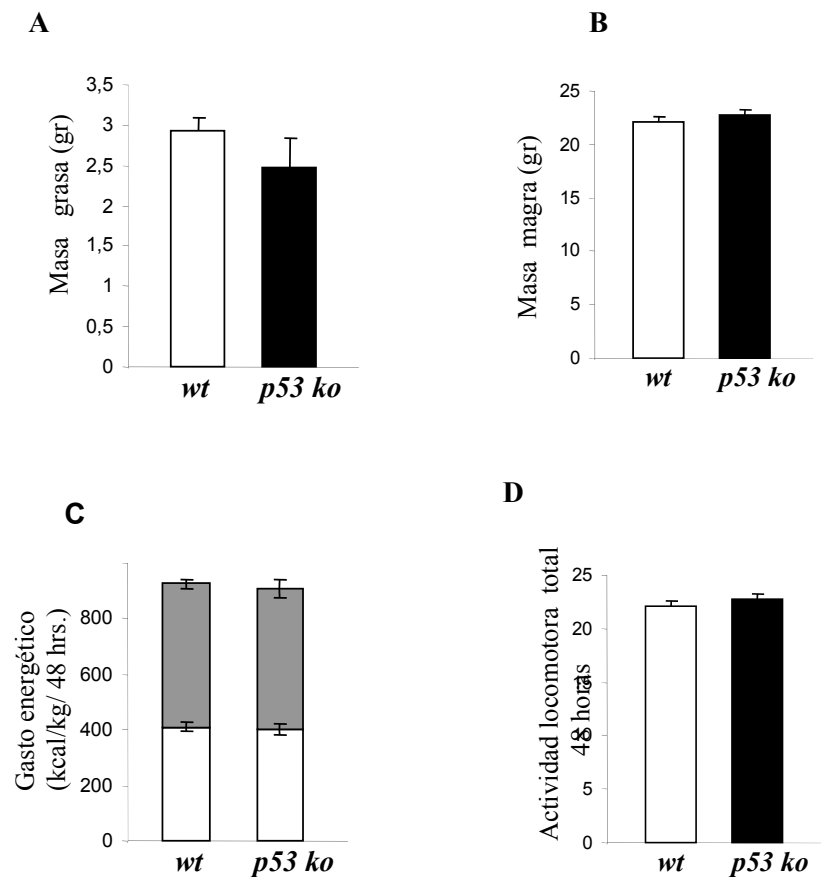
estándar *ad libitum*, luego se estabularon en 12 cajas individuales en el sistema de calorimetría durante 48 horas (ver materiales y métodos)

Partimos de los grupos anteriores:

12 ratones machos *wildtype* (controles)

12 ratones machos *knockout p53*

□ *wt STD*  
 ■ *ko STD*



**Fig. 2:** Efecto de la dieta estándar sobre la ganancia de masa grasa (A) y no grasa (B) gasto energético (C) y actividad locomotora (D) en ratones *wt* y *p53 ko*. El gasto energético y la actividad locomotora fueron monitorizados durante 48 horas durante la fase diurna (barras blancas) y fase oscura (barras grises). (n=12/grupo).

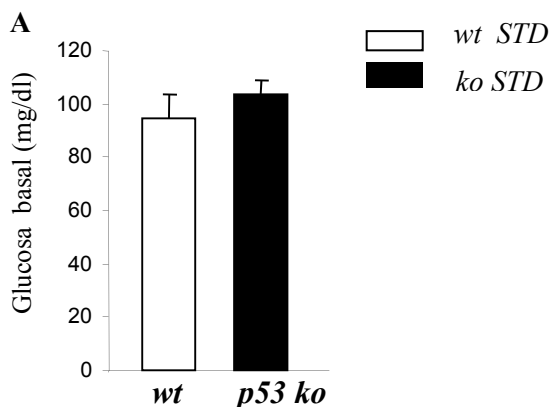
## RESULTADOS

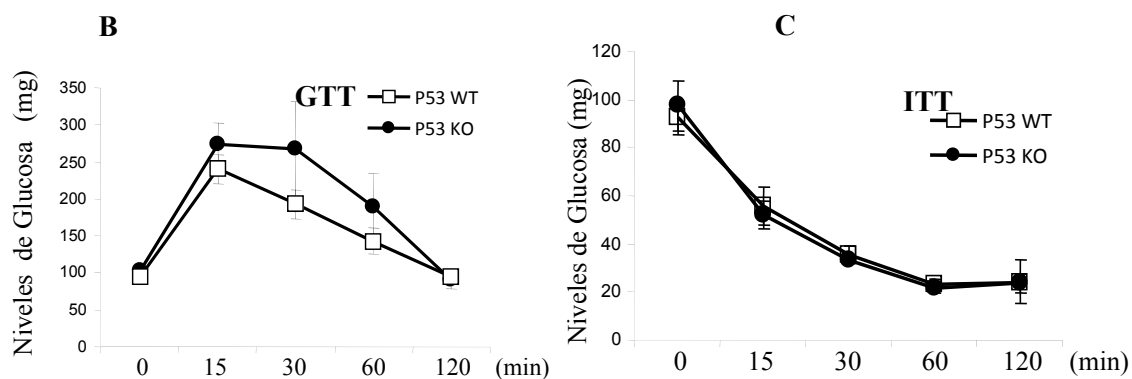
En estos resultados observamos que la administración de una dieta estándar durante 12 semanas, posterior a su destete no produce diferencias estadísticas significativas en los ratones *p53 ko* comparados con los *wt*, en relación a la ganancia neta de masa grasa, (Figura 2A) tampoco encontramos diferencias significativas en la masa magra (Figura 2B) entre ambos grupos.

En relación al gasto energético, pudimos observar que ambos grupos, *wt* y *p53 ko*, mantienen el mismo gasto energético con la misma actividad locomotora, tanto en la fase de luz como en la oscura. (Figura 2C y 2D). Estos resultados nos sugieren que la ausencia del gen *p53*, con una ingesta de una dieta estándar, no es un factor determinante en parámetros que influyen en el peso como son la ingesta y el gasto energético.

### *La dieta estándar no modifica el perfil glicémico de los ratones *p53 ko**

Como ya es sabido, muchos de los cambios en el metabolismo se reflejan en alteraciones de los niveles circulantes de glucosa, en la tolerancia a la glucosa ó en la sensibilidad a la insulina, por lo que en un último experimento con este tipo de dieta, evaluamos los niveles de glucosa basal, el test de tolerancia a la glucosa y el test de tolerancia a la insulina.





**Fig. 3:** niveles glucosa en ayuno (A), test de tolerancia a la glucosa (B), test de tolerancia a la insulina (C) en ratones *wt* y *p53 ko*, alimentados con una dieta estándar durante 12 semanas posterior a su destete. (n=12/grupo).

Observamos que los ratones *p53 ko* tienen los mismos niveles de glucosa en ayuno que los ratones *wt*. (Figura 1A). Además, al someterlos al test de tolerancia de glucosa, no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos. (Figura 2B). En el test de tolerancia a la insulina tampoco se observaron diferencia estadísticas significativas. (Figura 2C). Estos resultados indican que tanto el metabolismo de la glucosa como la sensibilidad a la insulina no estaban alterados en los ratones *p53 ko* alimentados con una dieta estándar.

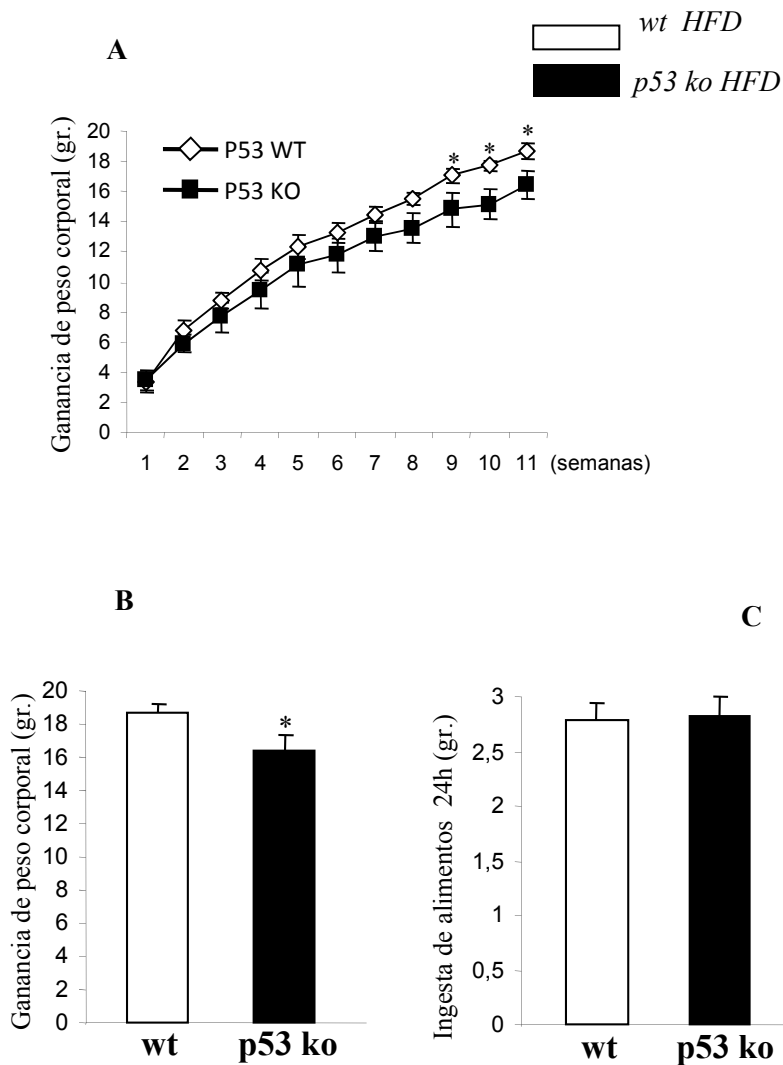
### **Efecto de la dieta alta en grasas (HFD) en ratones *p53 knockout***

Aunque la genética juega un papel importante en la homeostasis energética, existen otros factores externos o medioambientales como los diferentes tipos de dieta que determinan en un gran porcentaje la génesis de la obesidad. Diversos estudios epidemiológicos han demostrado la asociación entre obesidad y el tipo de dieta, especialmente la dieta alta en grasas (Jéquier E., 2002; Hill JO, et al, 2000) que conduce al aumento de la morbilidad, aumentando la frecuencia de enfermedades como la diabetes mellitus, hipertensión, enfermedades cardiovasculares, cáncer y otras.

Los ratones sometidos a una dieta alta en grasa son un modelo apropiado y muy común para el estudio de mecanismos implicados en el desarrollo de la obesidad. En el presente trabajo sometimos a ratones homocigotos *wildtype* y *p53 knockout*, a dietas altas en grasas (HFD 45 kcal% grasas) durante 12 semanas para inducirles obesidad, con el objetivo de observar los cambios en el peso corporal, composición corporal, perfil lipídico y cambios en los tejidos metabólicamente representativos en ausencia del gen *p53*.



*Los ratones deficientes del gen p53 ganan menos peso que los wt cuando se alimentan con una dieta alta en grasas.*

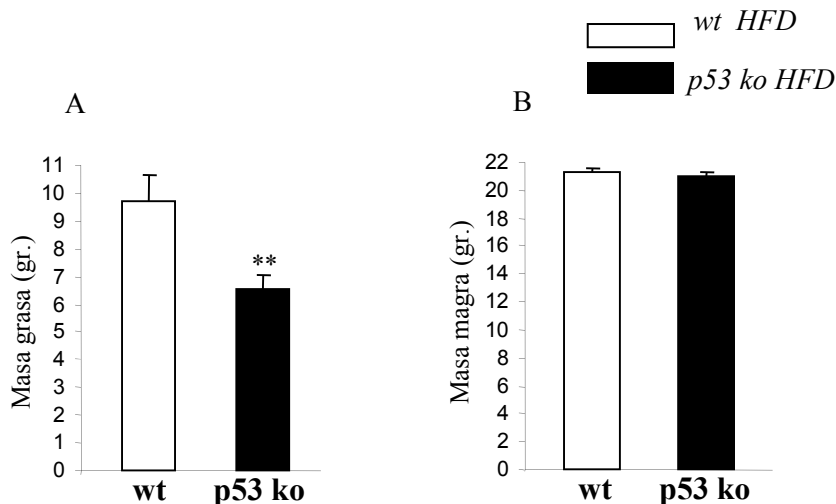


**Fig. 4:** Ganancia de Peso corporal (A y B) e ingesta diaria (C) en ratones machos *wt* y *p53 ko* alimentados con dieta HFD durante 12 semanas posterior a su destete. (n=12/grupo). \*P<0.05 en relación a sus controles.

## RESULTADOS

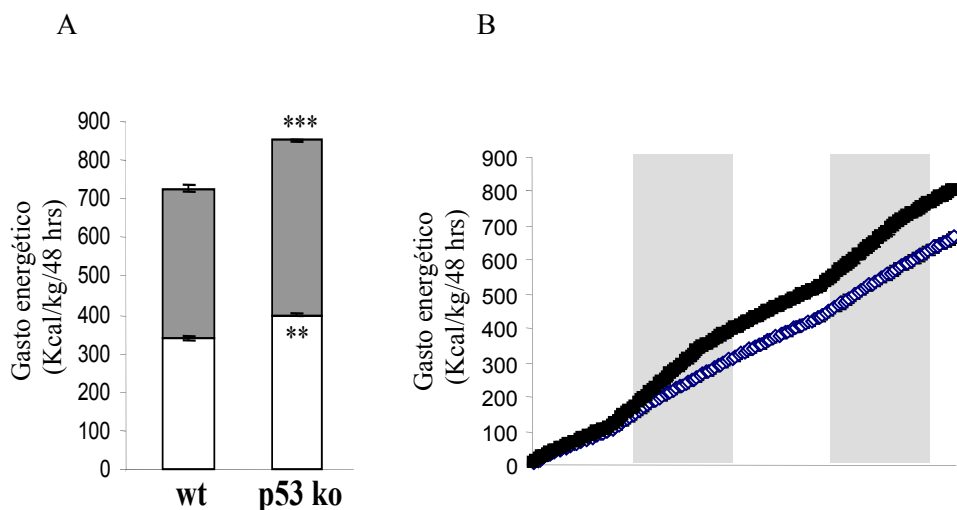
Nuestros resultados demuestran que los ratones *wt* alimentados con una dieta alta en grasas durante 12 semanas posterior a su destete, ganan más peso que los ratones *p53 ko*, (Figuras 4A, 4B) hecho que es independiente de la ingesta, en la cual no hubo diferencias significativas en ambos grupos. Podemos observar que la diferencia en la ganancia de peso se inicia desde las primeras semanas de alimentación con la dieta alta en grasas, diferencia que se hace más evidente y significativa a la novena semana de alimentación y permanece con esa tendencia hasta la 12<sup>a</sup> semana (Figura 4A), a pesar de mantener la misma ingesta entre ambos grupos.

Como sabemos existe una correlación positiva entre la cantidad de grasa de la dieta ingerida y la ganancia de peso así como el aumento del tejido adiposo (*Fenton PF & Dowling MT 1953*) tanto en ratas como en ratones, por lo que en nuestro siguiente experimento evaluamos la composición corporal en estos ratones sometidos a una dieta HFD, a través de resonancia magnética nuclear.

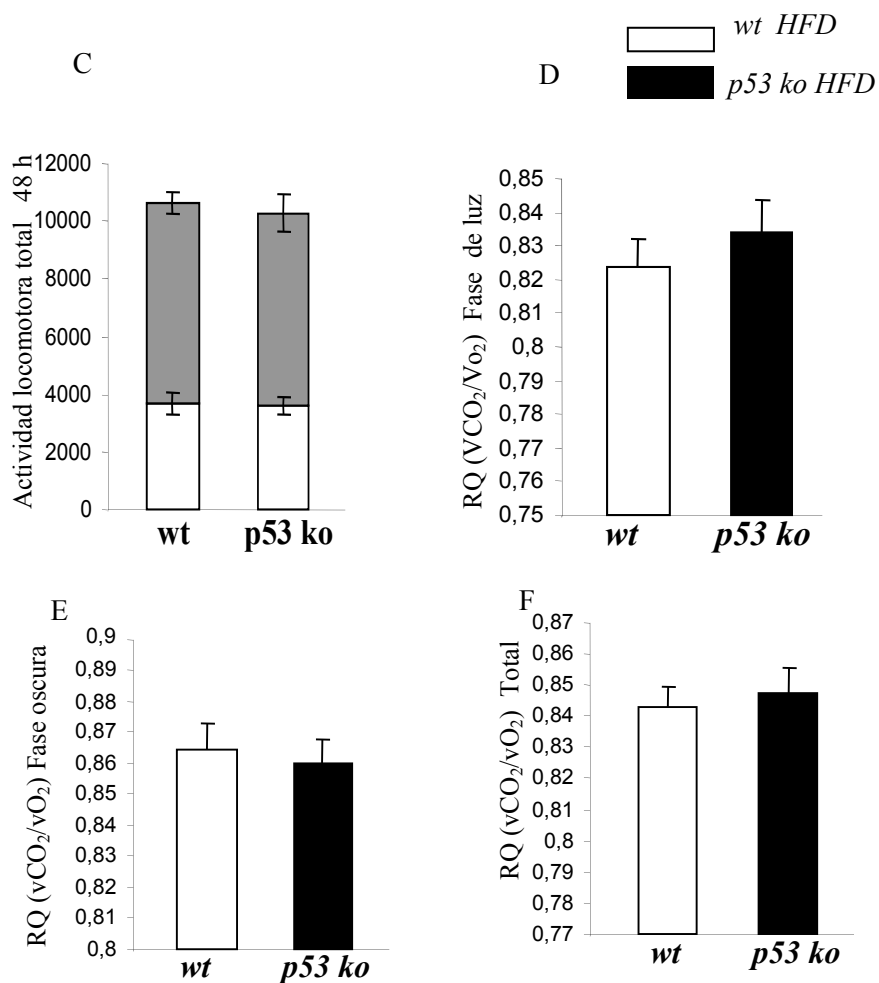


**Fig. 5:** Cantidad de masa grasa (A) y masa magra (B) en ratones *wt* y *p53 ko* alimentados con dietas alta en grasas durante 12 semanas posterior a su destete. (n=12/grupo). \*P<0.05, \*\*P<0.01 en relación a sus controles.

Como podemos observar, nuestros resultados demuestran que los ratones *p53 ko*, alimentados con una dieta HFD tienen menos cantidad de masa grasa que los ratones *wt* (Figura 5A). Dado que el peso corporal es determinado por la ingesta y el gasto energético, y que estos ratones *p53 ko* tienen menos peso corporal independiente de la ingesta, nuestro siguiente paso fue investigar la causa de esta menor ganancia de peso cuando los ratones son alimentados con una dieta alta en grasa. Por lo tanto en nuestro siguiente experimento determinamos por calorimetría indirecta el gasto energético, la actividad locomotora y el cociente respiratorio ( $RQ=VCO_2/VO_2$ ).



## RESULTADOS



**Fig. 6:** Gasto energético (A), gasto energético acumulado (B), actividad locomotora (C), cociente respiratorio RQ, en fase de luz (D), cociente respiratorio en fase oscura (E), cociente respiratorio total (F) en ratones *wt* y *p53 ko* machos alimentados con dieta alta en grasas durante 12 semanas posterior a su destete. (n=12/grupo). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  en relación a sus controles.

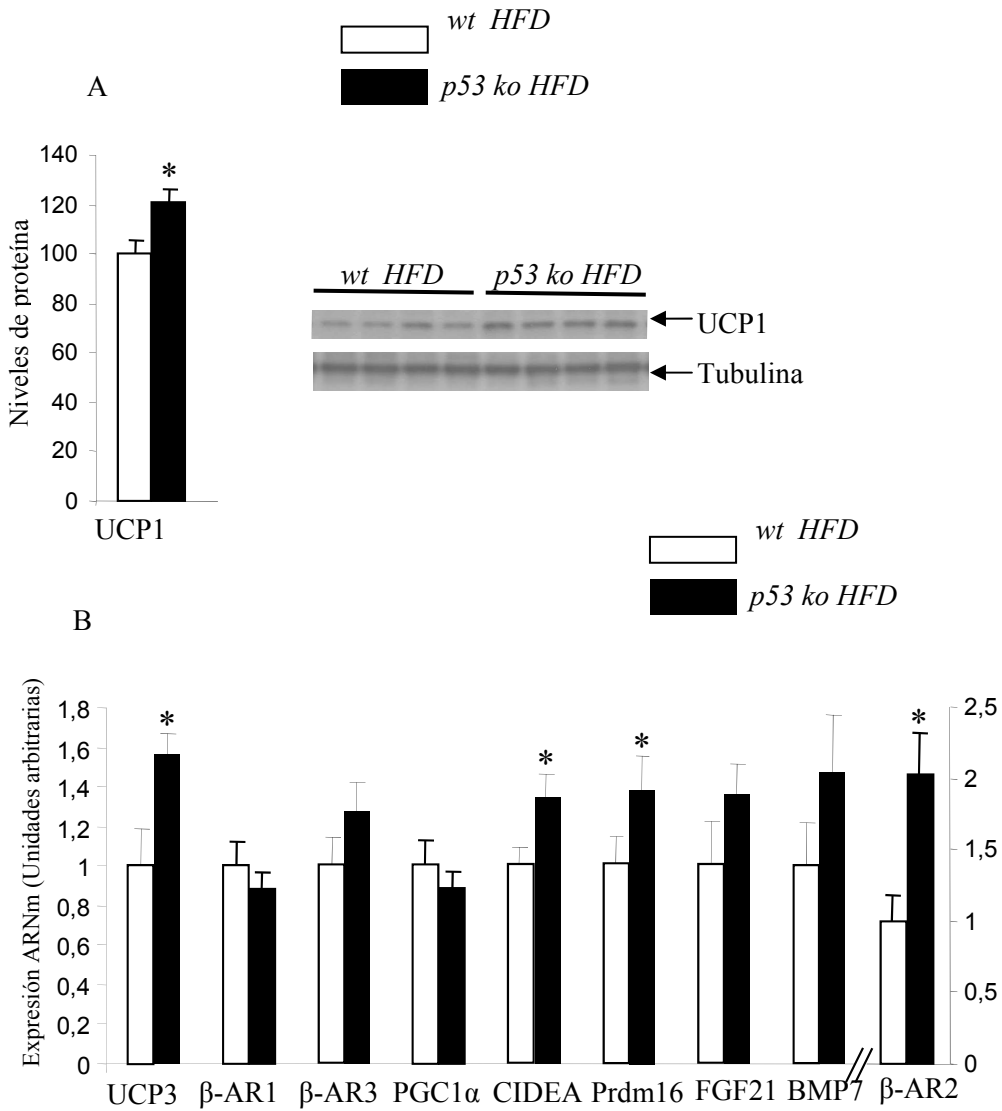
En un régimen alimenticio con una dieta alta en grasas, el gasto energético de los ratones *p53 ko* se encontró aumentado en relación a sus controles (Figuras 6A, 6B), con una misma actividad locomotora (Figura 6C) y sin cambios en el cociente respiratorio (Figuras 6D, 6E, 6F), tanto en la fase de luz como en la oscura. Esto explica en cierta forma el menor peso en los ratones *p53 ko*, ya que mantienen la misma ingesta, pero existe un aumento del gasto energético. Como sabemos, el gasto energético se encuentra determinado por el metabolismo basal, la actividad física y la termogénesis.

Estos ratones *p53 ko*, mantuvieron la misma actividad física (actividad locomotora/48 horas), lo que implica que la actividad física no es responsable del mayor gasto energético. Además, los *p53 ko* tienen un cociente respiratorio similar a sus controles, lo que nos sugiere que ambos grupos utilizan un mismo tipo de nutriente como sustrato energético. En nuestro siguiente experimento, investigamos cómo se encontraba la termogénesis en estos grupos.

### *Papel del tejido adiposo marrón en ratones p53 ko durante una dieta alta en grasas*

Como ya es sabido, el tejido más importante en la termogénesis es el tejido adiposo marrón (BAT), por lo cual en nuestro siguiente experimento evaluamos las enzimas y proteínas involucradas en la termogénesis a nivel del tejido adiposo marrón interescapular.

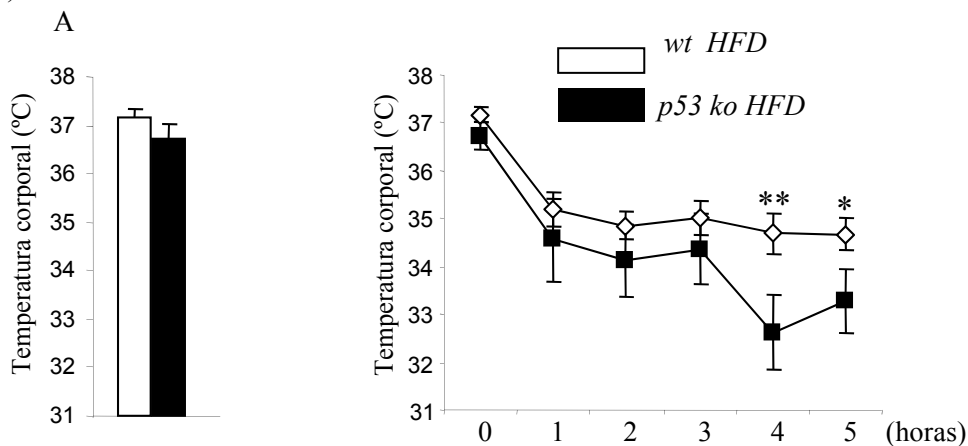
## RESULTADOS



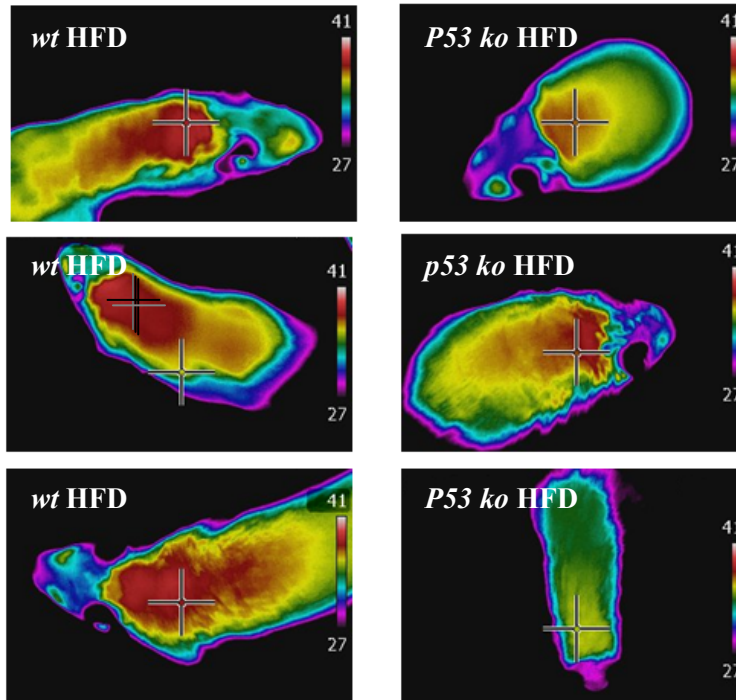
**Fig. 7:** Niveles de proteína (A) y niveles de ARNm (B) a nivel de tejido adiposo marrón interescapular (BAT) de ratones macho *wt* y *p53 ko*, alimentados con una dieta HFD durante 12 semanas desde su destete. (n=12/grupo) \*P<0.05 en relación a sus controles.

Los ratones *p53 ko* tienen niveles aumentados de UCP1 a nivel de proteína (Figura 7A) y la expresión génica de UCP3 y  $\beta$ -AR2 a nivel de ARNm (Figura 7B), se encontró elevada comparado con los ratones *wt*. UCP1 es una proteína que genera calor desacoplando la cadena respiratoria a nivel de la mitocondria, bajo control del sistema nervioso simpático (Klingenberg & Huang, 1999), y sus niveles se encuentran incrementados en los *p53 ko*, lo que en cierto modo explica que los ratones *p53 ko* tengan un mayor gasto energético y una disminución de peso independiente de la ingesta que los ratones *wt*. Observamos que los niveles de CIDEA (un regulador de vías metabólicas lipídicas y cuya ablación produce un fenotipo de ratón delgado y resistente a dietas obesogénicas, Zhou *et al*, 2003) y *prdm16* (un factor que favorece la diferenciación de los adipocitos marrones, Kajimura S. *et al*, 2010) se encontraban aumentados a nivel de ARNm (Figura 7B).

En base a los resultados anteriores, en nuestro siguiente experimento expusimos a los ratones *wt* y *p53 ko* a 4°C durante 5 horas (prueba aguda a la tolerancia al frío).



## RESULTADOS



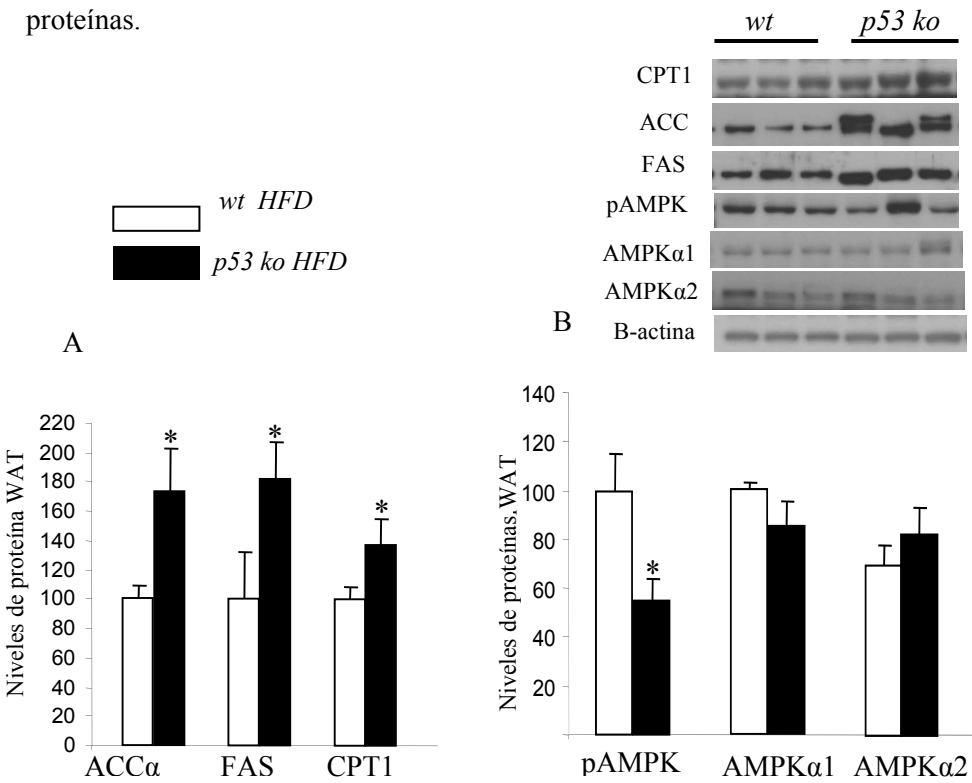
**Fig. 8:** Temperatura corporal basal (A), test de tolerancia al frio a 4°C, durante 5 horas (B), fotografías de BAT interescapular (cruces) con cámara térmica en un rango de temperatura de 27-41 °C en ratones *wt* y *p53 ko* HFD. (n=12/grupo).  $P<0.05$ ,  $**P<0.01$  en relación a sus controles.

Los ratones *p53 knockout* mostraron un descenso significativo de su temperatura corporal, durante las 5 horas a 4°C, en relación a sus controles (Figuras 8A, 8B). Estos resultados fueron corroborados con fotografías térmicas de BAT *in vivo* (Figura 8C), en las cuales observamos diferencias claras en la temperatura del BAT entre *wt* y *p53 ko*, observando una menor temperatura en el BAT de los ratones *p53 ko*.

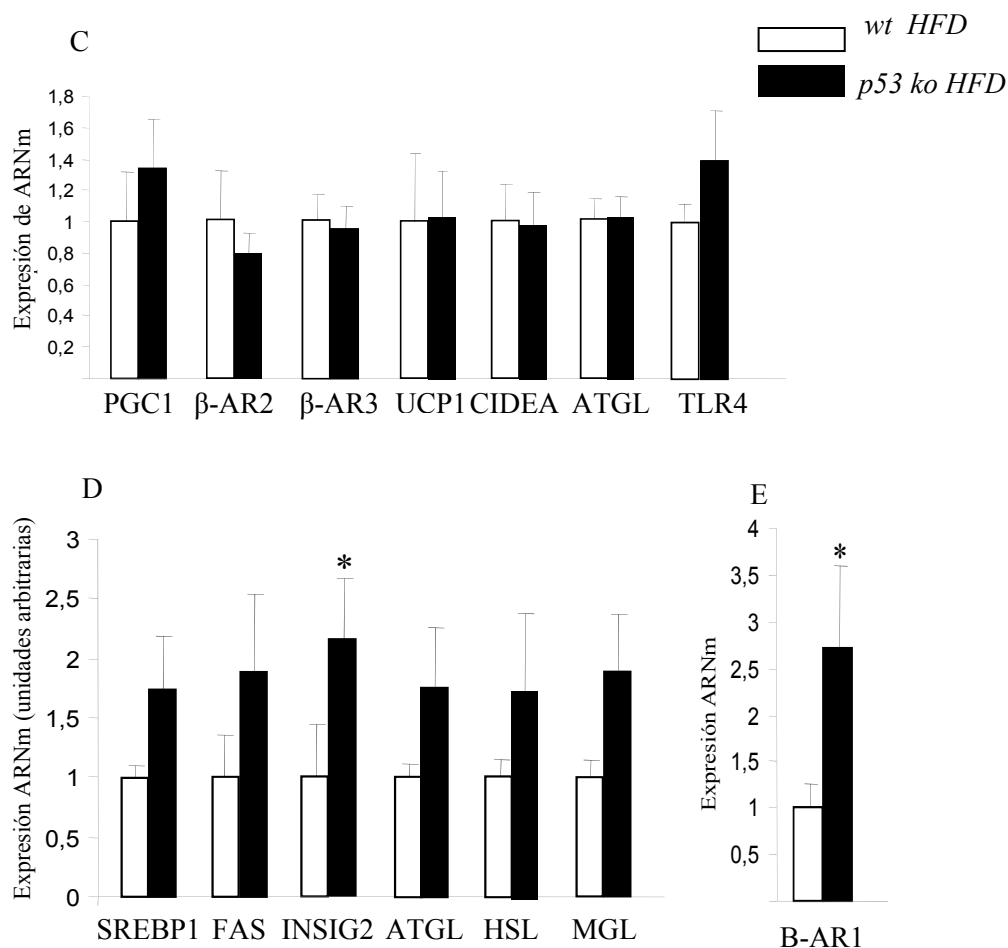


*Ecto de la dieta alta en grasas sobre el tejido adiposo blanco en ratones p53 ko*

Como sabemos, una de las principales funciones del tejido adiposo blanco es la de almacenar energía en forma de triacilglicéridos y liberar estos compuestos como ácidos grasos libres a los diferentes tejidos durante situaciones de stress o ayuno. En nuestros resultados pudimos observar que los ratones *p53 ko*, a pesar de estar ingiriendo una dieta alta en grasa, tienen cantidad de masa grasa menor que los ratones *wt*, por lo que evaluamos los niveles de varias enzimas involucradas en el metabolismo de los lípidos, tanto a nivel de ARNm como de proteínas.



## RESULTADOS



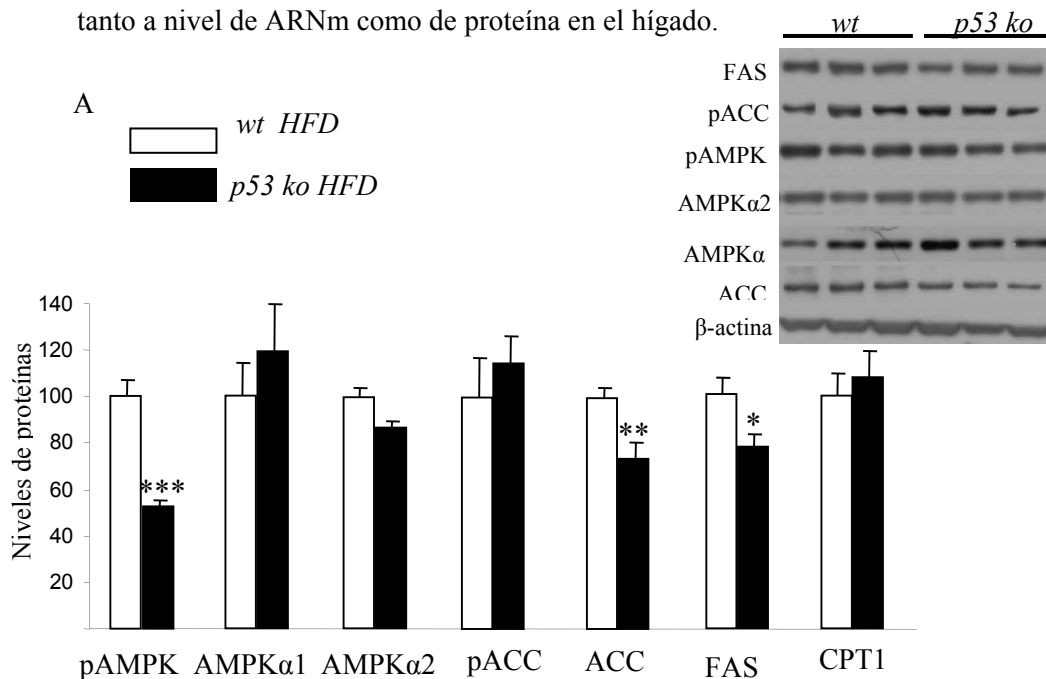
**Fig. 9:** Niveles de proteína (A y B) y de ARNm (C, D, E) en el tejido adiposo blanco en ratones *wt* y *p53 ko* alimentados con dieta alta en grasas durante 12 semanas. (n=12/grupo). \*P<0.05 en relación a sus controles.

Encontramos que la expresión génica de UCP1, FAS, PGC1 $\alpha$  y CIDEA no mostró cambio alguno entre ambos grupos (Figuras 9C, 9D), a excepción del receptor  $\beta$ -adrenérgico tipo 1, del cual encontramos una mayor expresión génica significativa en los ratones *p53 ko* en relación a sus controles, sugiriendo un mayor tono simpático a nivel del tejido adiposo blanco (WAT). A nivel de

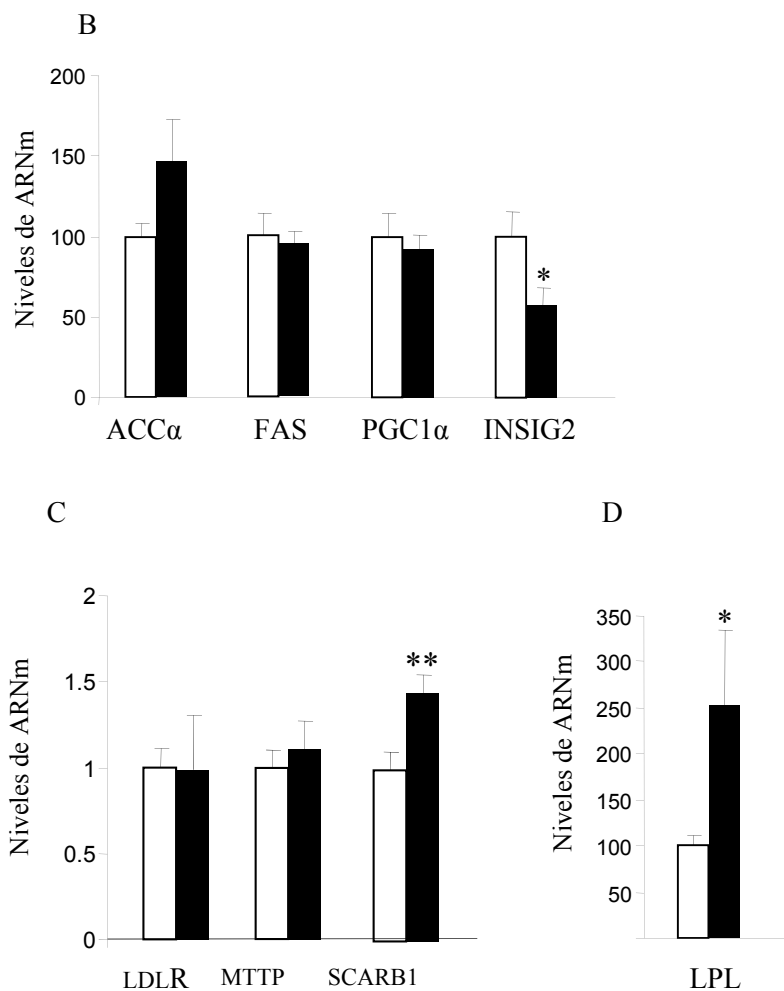
proteína, encontramos niveles disminuidos de pAMPK y niveles elevados significativamente de ACC $\alpha$ , CPT1 y FAS (Figuras 9A, 9D). Por lo tanto, estos resultados en su conjunto nos estaban indicando que, en cierta forma, tanto la oxidación como la síntesis de lípidos se encuentran activadas. Dado que los ratones *p53 ko*, ganan menos masa grasa, estos datos sugieren que el metabolismo basal está incrementando en los ratones *p53 ko* en comparación con los *wt*.

#### *Efecto de la dieta alta en grasas sobre el metabolismo hepático en ratones p53 ko*

Otro órgano importante en la captación y liberación de lípidos es el hígado. Este órgano es también uno de los más afectados durante la ingesta de dietas altas en grasas, ya que provocan esteatosis hepática (Dhibi *et al*, 2011). Por lo tanto, evaluamos los niveles de las enzimas involucradas en el metabolismo de lípidos tanto a nivel de ARNm como de proteína en el hígado.



## RESULTADOS



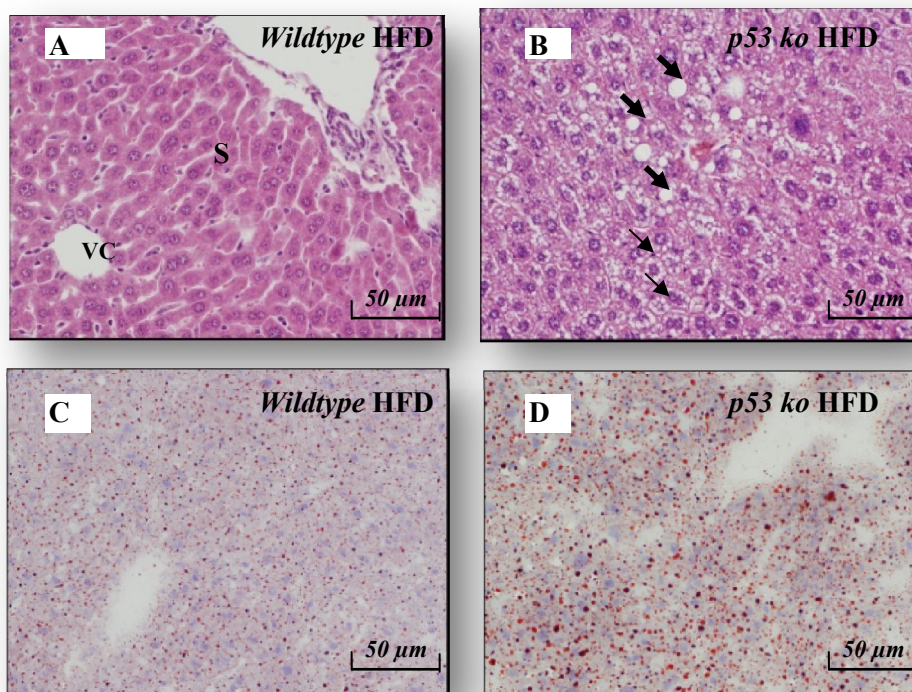
**Fig. 10:** Niveles de proteínas (A) y de ARNm (B, C, D) a nivel hepático en ratones *wt* y *p53 ko*, alimentados con dieta alta en grasas durante 12 semanas. (n=12/grupo). \*P<0.05, \*\*P<0.01 en relación a sus controles.

Como observamos en nuestros resultados, los niveles de proteína de pAMPK, ACC $\alpha$  y FAS se encontraron disminuidos (Figura 10A), mientras que a nivel de expresión génica no encontramos diferencias significativas en ACC $\alpha$ , FAS, PGC1 (Figuras 10C, 10D, 10E) entre ambos grupos.

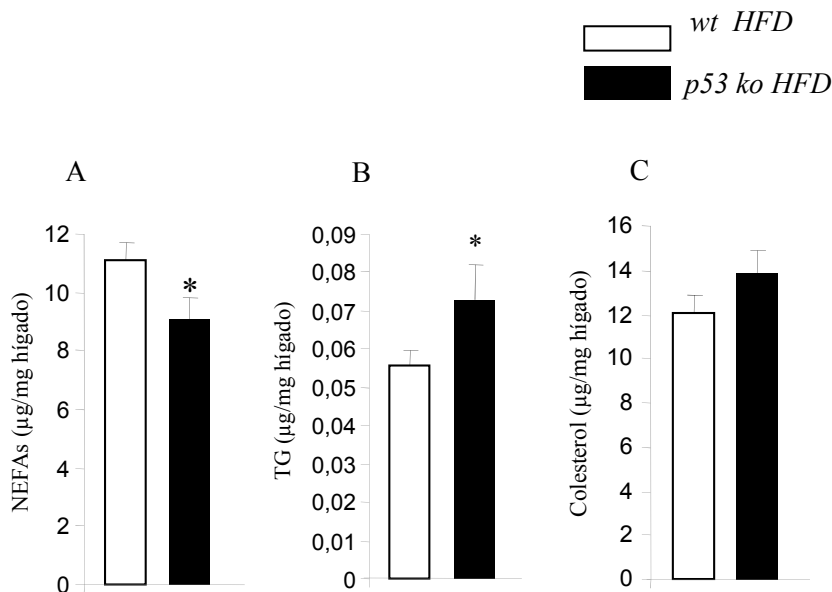
Sin embargo, la expresión de Scarb1 (involucrada en la recaptación de lipoproteínas de alta densidad, HDL) y la expresión génica de LPL (Figura 10C, 10D), involucrado en la hidrólisis y captación de TAG circulantes, se encontró significativamente aumentada en los ratones *p53 ko*. Esto nos estaba indicando que los TAG provenientes de los quilomicrones y los ácidos grasos libres (FFA unidos a albúmina) provenientes del tejido adiposo blanco, estaban siendo captados y almacenados a nivel hepático en una mayor proporción en los ratones *p53 ko* que sus controles.

Estos datos moleculares implican que debería existir una mayor cantidad de grasas almacenadas a nivel hepático, lo que produciría una mayor esteatosis hepática en los ratones carentes del gen p53. Por lo que en nuestro siguiente experimento analizamos histológicamente los hígados de los ratones *wt* y *p53 ko*, por medio de tinciones de hematoxilina-eosina y OIL RED, y evaluamos el perfil lipídico en ambos grupos de ratones.

## RESULTADOS



**Fig. 11:** (Panel A y C) Aspecto histológico de cortes de hígado de ratones *wt* HFD, donde se aprecia vena central (VC) y sinusoides (S) embebidos en tejido conectivo, con tinción de hematoxilina-eosina y Oil red (puntos rojos), respectivamente./(Panel B y D) Severa acumulación macro y microvesicular de lípidos (flechas negras) y hepatocitos en balón en cortes histológicos de hígados de ratones *p53 ko* HFD, con tinciones de hematoxilina-eosina y oilred (puntos rojos) en hígado en ratones *p53 ko* HFD.



**Fig. 12:** Niveles de ácidos grasos no estereificados NEFAs (A), TAG (B) y colesterol total(C), en hígado de ratones *wt* y *p53 ko* alimentados con HFD. (n=12/grupo). \*P<0.05, en relación a sus controles.

Como podemos observar, en los cortes histológicos de hígado de los ratones *p53 ko*, existe una infiltración de lípidos tanto macro como microvesicular a nivel del hepatocito (Figura 11, panel B y D) hallazgos que son bien conocidos y característicos de una esteatosis hepática producida por la ingesta alta en grasas (Dhibi *et al*, 2011; Angulo, 2002). Esta infiltración de lípidos en el hígado de los ratones *p53 ko* es mayor que en los hígados de los ratones *wt*.

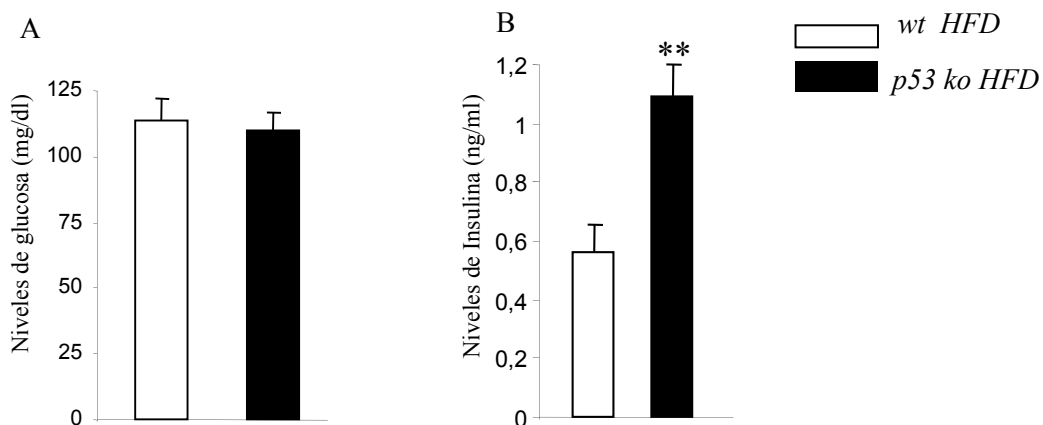
En adición a estos resultados, encontramos los niveles hepáticos de ácidos grasos no estereificados (NEFAS) disminuidos y la cantidad de TG en hígado aumentados en los ratones *p53 ko* (Figura 12A, 12B), lo que junto a los

## RESULTADOS

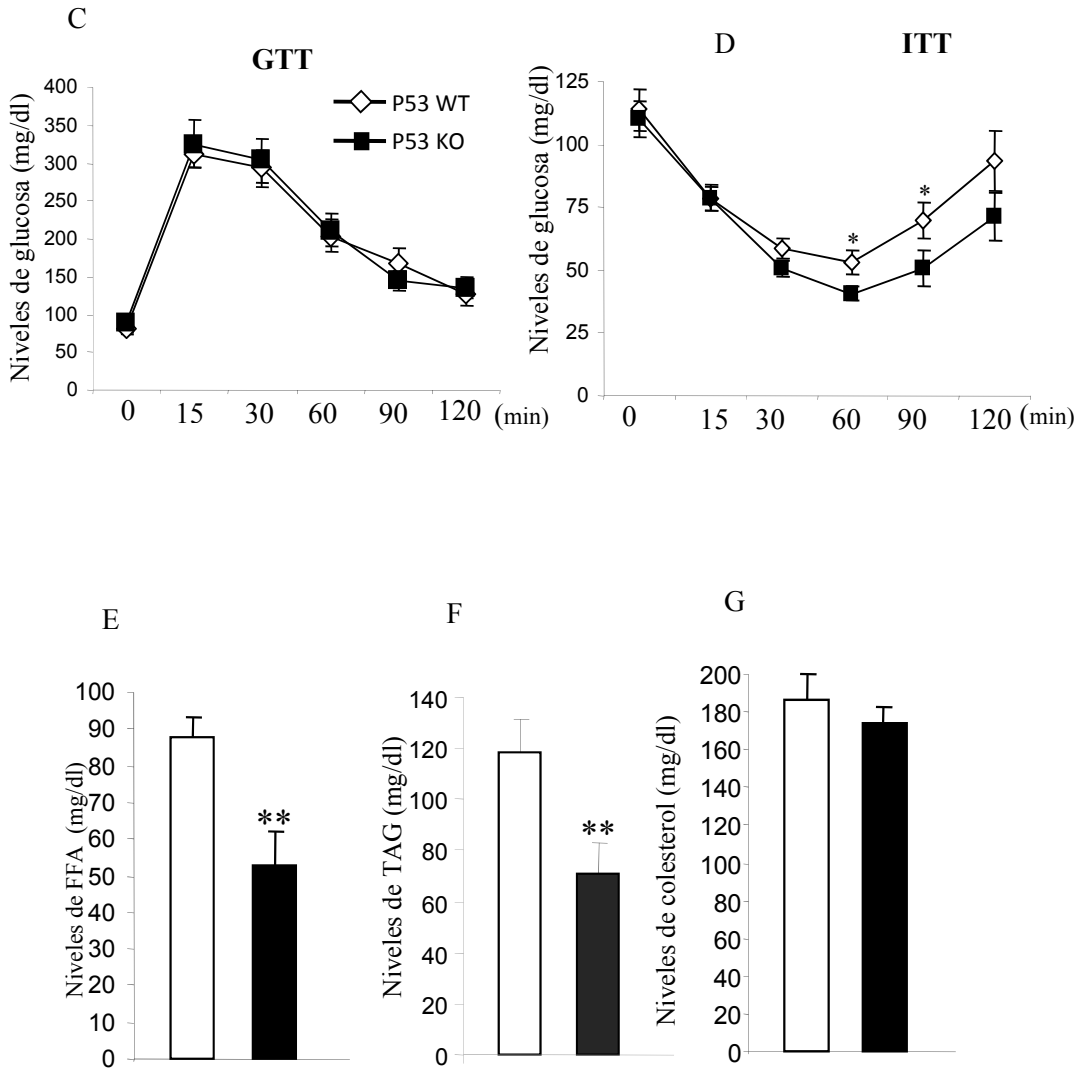
hallazgos histológicos hepáticos y a la mayor expresión génica de LPL en estos ratones *p53 ko* HFD, nos sugiere una mayor captación y almacenamiento de grasa en el hígado.

*Efecto de la dieta alta en grasas sobre el perfil glicémico y lipídico en ratones *p53 ko*.*

A continuación evaluamos el efecto que tiene la dieta HFD sobre los niveles de lípidos y glucosa en sangre, debido a que existe una relación directa entre la ingesta excesiva de grasas, obesidad y resistencia a insulina que produce alteraciones en el metabolismo de los lípidos y la glucosa. Con este fin, realizamos el test de tolerancia a la glucosa e insulina, como se ha descrito anteriormente (ver materiales y métodos) y medimos los niveles circulantes de TAG, NEFAS y colesterol.







**Fig. 13:** Glucosa Basal en ayuno (A), Niveles de insulina (B) test de tolerancia a la glucosa (C), test de tolerancia a la insulina (D), NEFAS (E), TAG (F), niveles de colesterol (G) en ratones *wt* y *p53 ko* HFD. (n= 12/grupo). \*P<0.05, \*\*P<0.01 en relación a sus controles.

## RESULTADOS

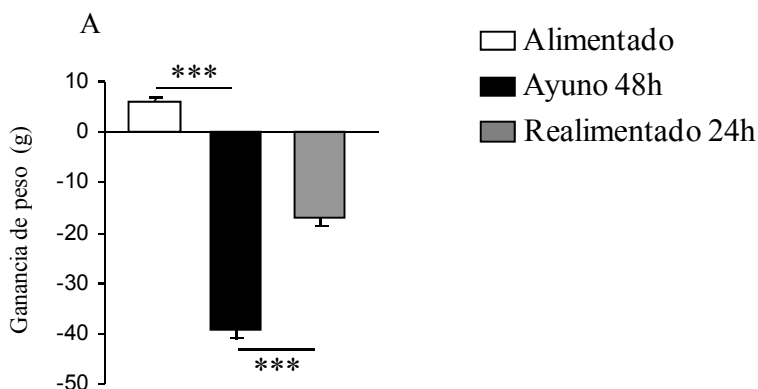
Encontramos que la ingesta alta en grasas no alteró los niveles basales de glucosa en los ratones *p53 ko* en relación a sus controles (Figura 13A). Similares resultados se observaron en el test de tolerancia a la glucosa (GTT) posterior a la administración intraperitoneal de glucosa (2 mg/kg) (Figura 13C), sugiriendo una respuesta similar de los tejidos *wt* y *p53 ko* a la carga de glucosa. Sin embargo en el test de tolerancia a la insulina (ITT) (Figura 13D) observamos que los ratones *p53 ko* tienen unos niveles de glucosa menores tras la administración de insulina (0.75 U/kg) lo que se interpreta como una mayor sensibilidad a la insulina en los ratones *p53 ko*. Por otra parte, los niveles séricos de FFA y de TAG los encontramos disminuidos significativamente en los ratones *p53 ko*, sin cambios en los niveles de colesterol. (Figuras 13E, 13F, 13G).

## RELACION ENTRE P53, SIRT1 Y GHRELIN EN RATAS SPRAGUE DAWLEY Y RATONES P53 KO.

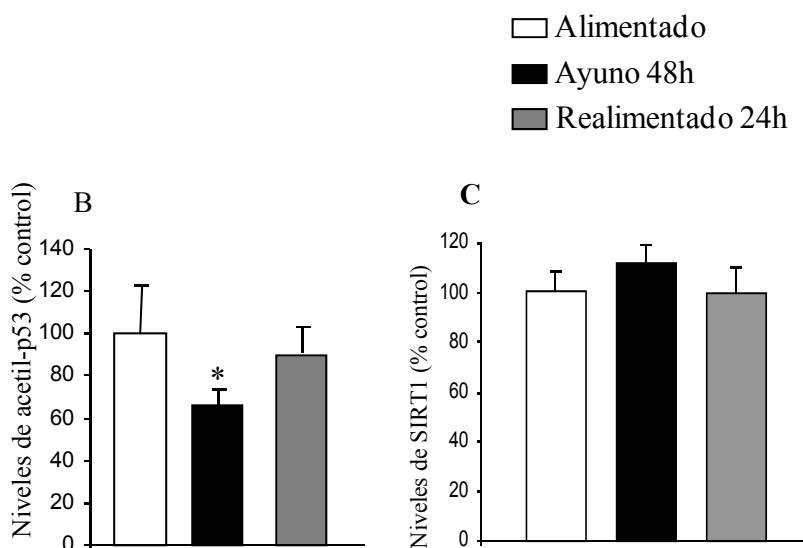
Ghrelin es un péptido derivado del estómago que incrementa la ingesta y estimula la adiposidad. SIRT1 es una desacetilasa dependiente de  $\text{NAD}^+$ , la cual es activada en respuesta a la restricción calórica y ayuno, y una de sus dianas es la proteína supresora de tumores p53. Dada la característica de ghrelin, de ser la única hormona peptídica orexigénica y la característica de SIRT1y p53, los cuales se encuentran relacionados con el estado nutricional ó la restricción calórica, analizamos el efecto del estado nutricional, y los niveles proteicos de SIRT1 y acetil-p53 en el hipotálamo.

*Efectos del estado nutricional sobre el peso y niveles de proteínas en hipotálamo de ratas Sprague-Dawley.*

Para llevar a cabo este experimento sometimos a ratas macho *sprague-Dawley* a ayuno durante 48 horas. El experimento se inició a las 6 pm para coincidir con el ciclo de alimentación (fase oscura) de las ratas.



## RESULTADOS



**Fig. 14:** Ganancia de peso en ratas alimentadas *ad libitum*, ayuno de 48 horas y realimentadas a las 24 horas(A). Niveles de proteína Acetil-p53 (B) y niveles de proteína SIRT1(C) a nivel de hipotálamo de ratas *Sprague-Dawley*. Los análisis de proteína son a través de *Western Blotting*. (n=8/grupo). Siendo: \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$  en relación a sus controles.

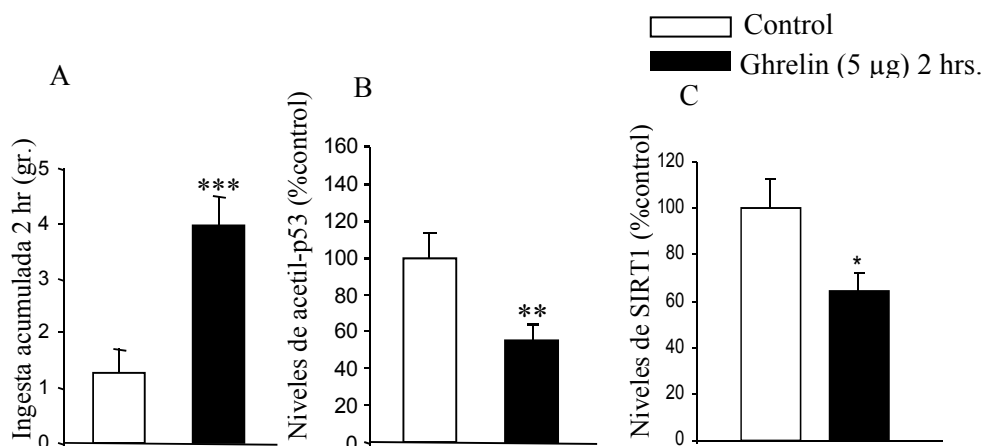
Pudimos comprobar las diferencias significativas en el peso entre el grupo de ratas alimentadas *ad libitum* con las del grupo sometidos a ayuno de 48 horas, las cuales perdieron peso corporal, mientras las realimentadas recobraron parcialmente el peso inicial (Figura 14A). Luego, para valorar la actividad de SIRT1 a nivel del hipotálamo, analizamos los niveles de acetil-p53, el cual se ha demostrado que es un marcador de la actividad de SIRT1 *in vivo* (Han MK *et al*, 2008). Los niveles hipotalámicos de acetil-p53 se encontraron disminuidos significativamente en el grupo de ratas macho sometidos a ayuno, mientras que esta disminución no se observó en ratas realimentadas a las 24 horas (Figura 14B). También valoramos los niveles de proteína hipotalámicos de SIRT1, sin encontrar cambios significativos en estos grupos de ratas (Figura 14C). Por lo

tanto estos resultados demuestran que durante un ayuno de 48 horas la actividad de SIRT1 sobre acetil-p53 se encuentra aumentada, desacetilándolo de una manera significativa, datos que coinciden con diversos estudios que establecen la relación entre la restricción calórica y SIRT1 y p53 (Guarente L, 2005).

#### *Efectos de ghrelin sobre ingesta y niveles de proteína en ratas Sprague-Dawley*

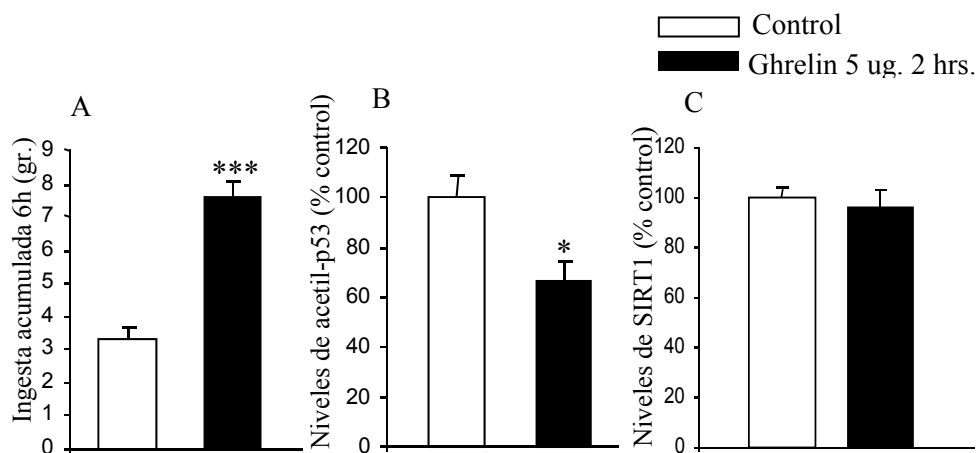
A continuación valoramos la hipótesis de que la administración central de ghrelin podría actuar sobre SIRT1 a nivel del hipotálamo.

Para comprobar el efecto de ghrelin sobre la ingesta y sobre SIRT1/acetil-p53 a nivel del hipotálamo, administramos ghrelin i.c.v. y se monitorizó la ingesta después de 2 y 6 horas en ratas macho *Sprague-Dawley*.



**Fig. 15:** Ingesta acumulada a las 2 horas (A), niveles de proteína hipotalámicos de acetil-p53 (B), y de SIRT1 (C) en ratas macho *Sprague-Dawley* después de 2h de la administración i.c.v. de ghrelin. El análisis se hizo a través de *Western Blotting*. (n=8 por grupo). Siendo: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 en relación a sus controles.

## RESULTADOS



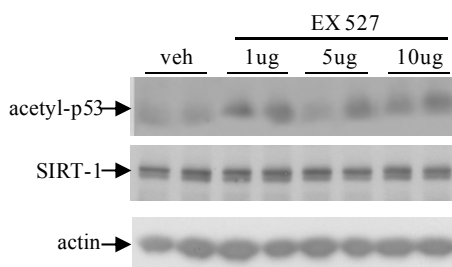
**Fig. 16:** Ingesta acumulada a las 6 horas (A), niveles de proteína hipotalámicos de acetil-p53 (B) y de SIRT1 (C) en ratas macho *Sprague-Dawley* después de 6h de la administración i.c.v. de ghrelin. Los análisis se realizaron a través de Western Blotting, (n=8/grupo). Siendo: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  en relación a sus controles.

La administración de ghrelin estimuló la ingesta significativamente a las 2 y 6 horas de su administración i.c.v. (Figuras 15 y 16), resultados que coinciden con publicaciones anteriores (Kojima M, 1999; Wren AM, 2000). También observamos que los niveles hipotalámicos de acetil-p53 se encontraron disminuidos en el grupo de ratas tratadas con ghrelin, efecto que se observa tanto a las 2 como a las 6 horas, en relación a sus controles (Figuras 15B, 16B). La disminución de los niveles hipotalámicos de p53 acetilado implica una estimulación de la actividad de SIRT1 en el grupo de ratas tratadas con ghrelin. Los niveles de proteína de SIRT1 en el hipotálamo disminuyeron a las 2 y no variaron a las 6 horas (Figuras 15C, 16C).

*El bloqueo farmacológico de SIRT1 a nivel central disminuye la acción orexigénica de ghrelin.*

Con los resultados anteriores, investigamos la hipótesis de que el incremento de la ingesta producido por ghrelin fuese mediado, al menos parcialmente por la actividad hipotalámica de SIRT1. Para ello realizamos un bloqueo farmacológico de SIRT1 a nivel central con el EX527 (*6-Chloro-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazole-1-carboxamide*, Tocris Bioscience, USA) un potente inhibidor específico de la actividad de SIRT1. (Solomon *et al*, 2006)

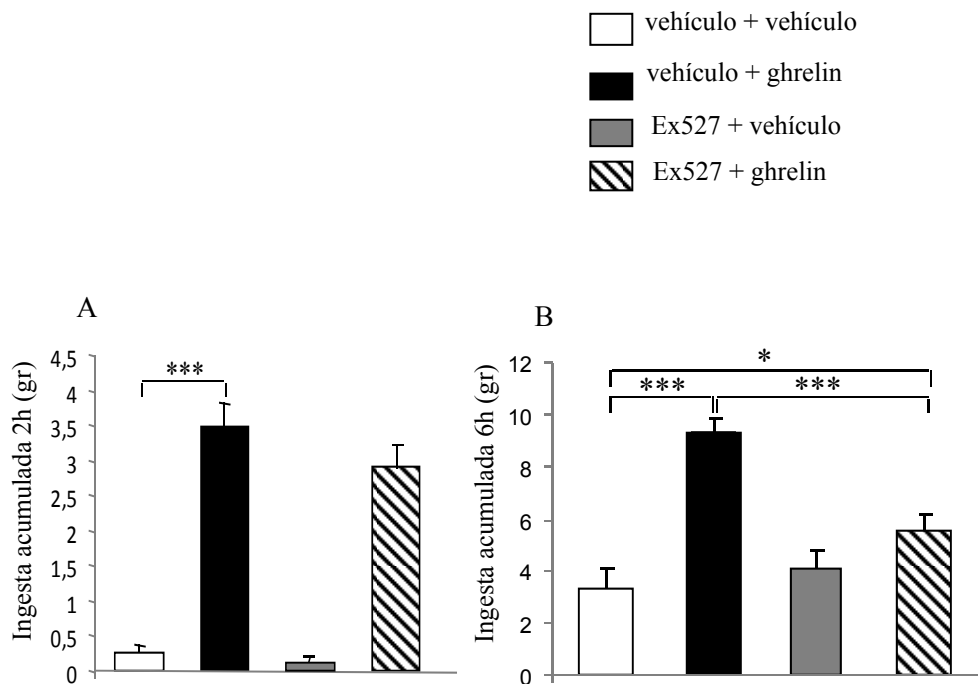
En primer lugar observamos que la administración i.c.v. de EX527, a diferentes dosis (1 ug, 5 ug y 10 ug) aumentaron los niveles hipotalámicos de acetil-p53 en relación a sus controles (Fig. 17), lo que indica que este compuesto disminuye la actividad de SIRT1 a nivel del hipotálamo *in vivo* inhibiendo la acción de SIRT1 sobre los niveles de acetil-p53.



**Fig. 17:** Niveles de proteína hipotalámicos de acetil-p53 y de SIRT1, tras la administración de EX 527 a diferentes dosis (1 ug, 5 ug y 10 ug) en ratas macho *Sprague-Dawley*.

## RESULTADOS

En un segundo experimento administramos a nivel central i.c.v.: ghrelin, EX527 y EX527 previo a la administración de ghrelin.



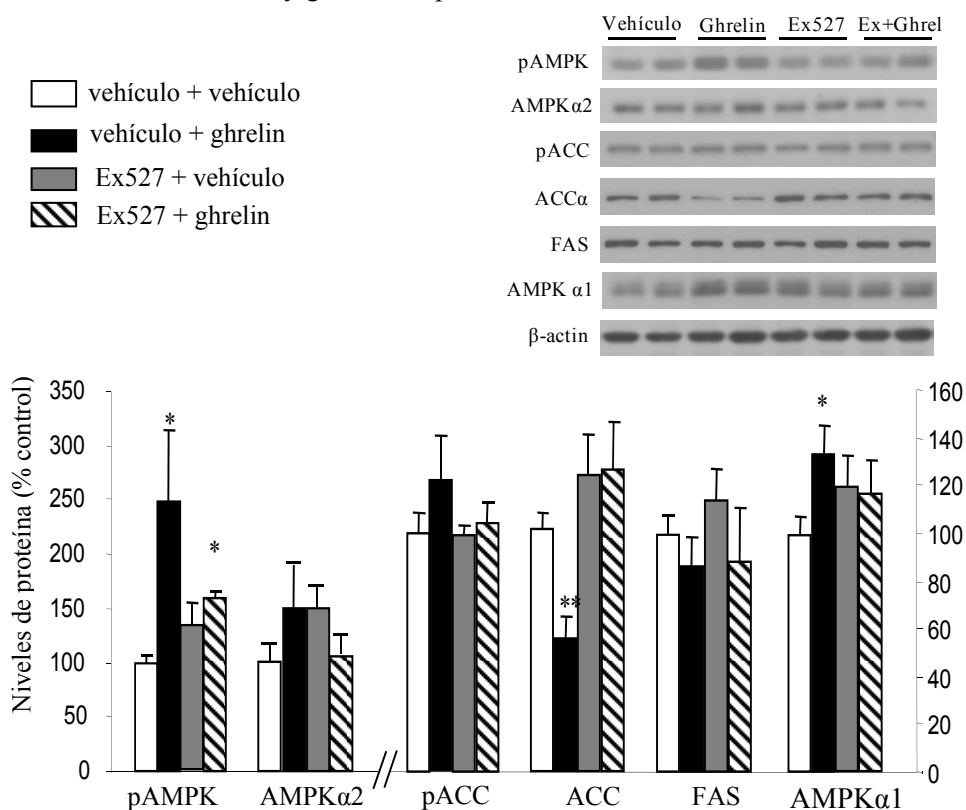
**Fig.18:** Efecto del bloqueo farmacológico de SIRT1 sobre la ingesta después de 2 horas (B) y 6 horas (C) posterior a la administración de EX527 (10 ug) y ghrelin (5 ug) i.c.v. en ratas macho *Sprague-Dawley*. (n=8/grupo). Siendo: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  en relación a sus controles.

En este experimento comprobamos que ghrelin aumentó la ingesta después de las 2 y 6 horas de su administración i.c.v., como era de esperar. Sin embargo, cuando el inhibidor de SIRT1, EX527, se administró 20 minutos previo a ghrelin, la acción orexigénica de ghrelin fue bloqueada notablemente después de 6 horas (Figura 18A, 18B). Estos resultados demuestran que la acción orexigénica de ghrelin depende parcialmente de SIRT1.



*Efecto del bloqueo de SIRT1 sobre la acción de ghrelin en el metabolismo de ácidos grasos a nivel del hipotálamo.*

Ghrelin aumenta la ingesta de alimentos a través de sus efectos sobre la activación de la proteína kinasa dependiente de AMP, AMPK y sobre el metabolismo de ácidos grasos a nivel del hipotálamo (López M, 2010). En nuestro siguiente experimento evaluamos los niveles de las principales enzimas involucradas en el metabolismo lipídico a nivel del hipotálamo en las ratas tratadas con EX527 y ghrelin después de 6 horas.



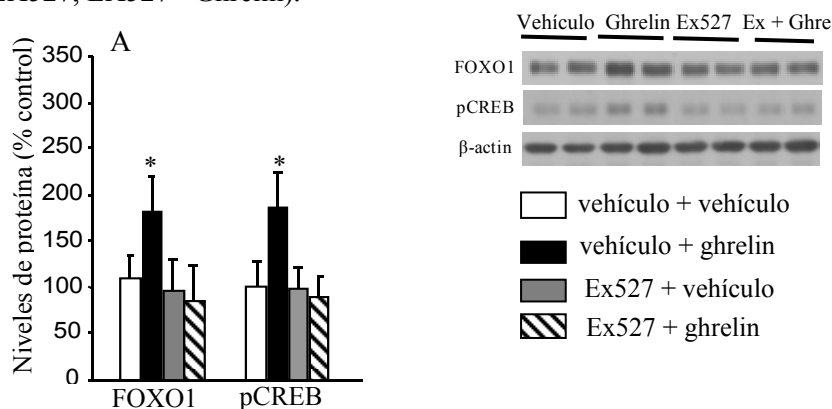
**Fig. 19:** Efecto del tratamiento agudo con EX527 (10 µg) y ghrelin (5 µg) i.c.v., a las 6 horas, sobre los niveles de proteínas involucradas en el metabolismo de lípidos en hipotálamo de ratas macho *Sprague-Dawley*. El análisis de proteínas se realizó a través de Western Blotting, (n= 8/grupo). Siendo: \*p<0.05, \*\*p<0.01 en relación a sus controles.

## RESULTADOS

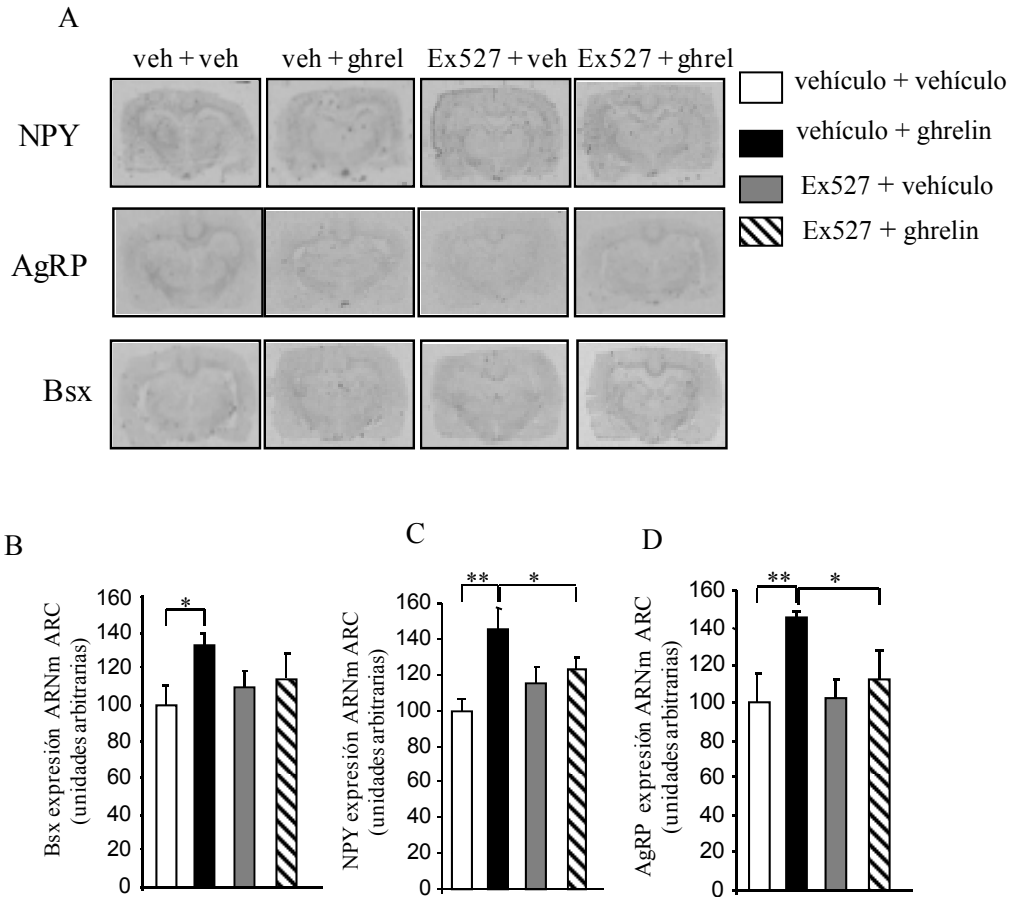
En estos resultados, como era esperado, después de las 6 horas de la administración i.c.v. de ghrelin, los niveles de pAMPK hipotalámicos se incrementaron significativamente, mientras que los niveles de ACC disminuyeron (Figura 19). Estos efectos fueron bloqueados cuando el EX527 se administró previamente a ghrelin, sugiriendo que el efecto de ghrelin sobre AMPK, estaba mediado por SIRT1 y estableciendo una nueva relación entre ghrelin-SIRT1 y AMPK.

*Efecto del bloqueo de SIRT1 sobre la acción de ghrelin en la expresión de factores de transcripción y neuropéptidos mediadores de la ingesta.*

Sabemos que ghrelin, a nivel del hipotálamo activa a AMPK, causando importantes cambios en la respiración mitocondrial y alterando la expresión de factores de transcripción como Bsx, Forkhead box O (FoxO1) y pCREB y que esto conduce a la activación de neuropéptidos como AgRP/NPY (Nogueiras R, 2010). Por lo tanto, evaluamos estos factores de transcripción y neuropéptidos en los grupos experimentales descritos anteriormente (Controles, Ghrelin, EX527, EX527+ Ghrelin).



**Fig. 20:** Niveles de proteína FoxO1 y pCREB en hipotálamo tras la administración de EX527 y ghrelin i.c.v. después de 6 horas en ratas macho *Sprague-Dawley*, el análisis se hizo a través de western Blotting. (n= 8/grupo). Siendo: \* $p < 0.05$  en relación a sus controles.



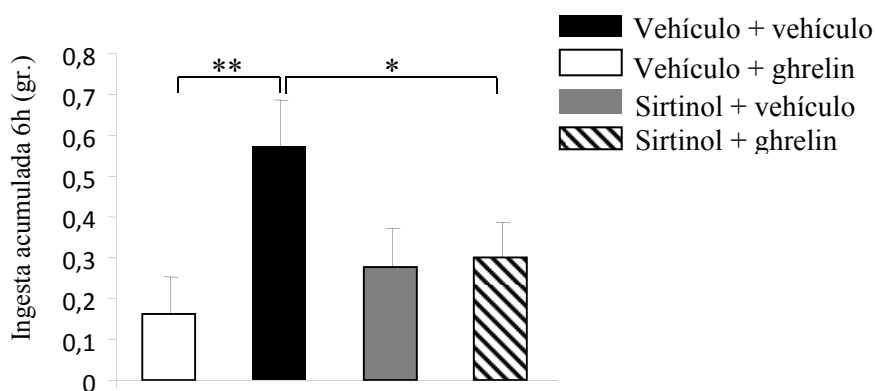
**Fig. 21:** Efecto de la administración de EX527 (10 ug) y ghrelin (5 ug) i.c.v. después de 6 horas, sobre la expresión del ARNm de Bsx, NPY y AgRP en el núcleo arcuato (A, B, C, D) de ratas macho *Sprague-Dawley*. El análisis se hizo por medio de la técnica de hibridación *in situ* (n=8/grupo): \*p<0.05, \*\*p<0.01 en relación a sus controles.

En estos resultados observamos que la expresión, inducida por ghrelin sobre los factores de transcripción FoxO1, pCREB y Bsx, además de los neuropéptidos NPY y AgRP a nivel del núcleo arcuato, disminuyó cuando administramos EX527 previamente a ghrelin (Figura 20 y 21). Estos resultados en su conjunto,

## RESULTADOS

demuestran que las acciones orexigénicas de ghrelin se encuentran mediadas en parte por SIRT1 y que la activación de la actividad hipotalámica de SIRT1 es un evento anterior a las alteraciones provocadas por ghrelin sobre AMPK, metabolismo lipídico, factores de transcripción y neuropéptidos.

En nuestro siguiente experimento utilizamos otro inhibidor específico de la actividad de SIRT1, el Sirtinol. Obtuvimos similares resultados a aquellos observados con EX527, sobre la ingesta. (Figura 22)

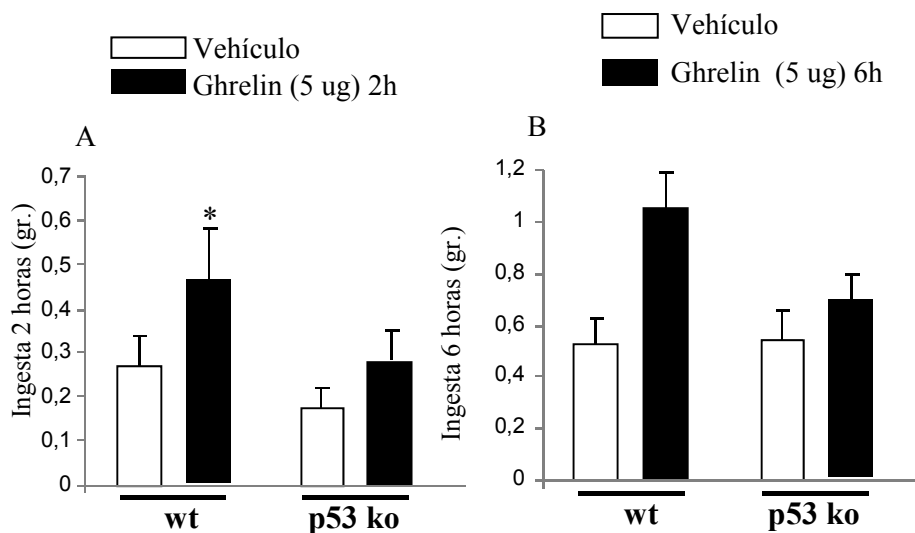


**Fig. 22:** Efectos de la inyección i.c.v. de ghrelin (5 ug), sirtinol (10 ug), y ghrelin + sirtinol sobre la ingesta de alimentos después de 6h. (n=8/grupo). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  en relación a sus controles.

### *Efectos de ghrelin sobre la ingesta y el metabolismo de ácidos grasos en ratones p53 KO*

Como hemos comprobado, acetil-p53 es uno de los sustratos de SIRT1 y la inhibición de este último disminuye la acción orexigénica de ghrelin. Según literatura reciente p53 se encuentra relacionado con el metabolismo y homeostasis energética (Vousden KH, 2009) y nuestros resultados iniciales demuestran una diferencia tanto a nivel tisular como metabólica entre los

ratones *wt* y *p53 ko*. Dada toda esa relación, nosotros nos planteamos si *p53* podría ser un mediador de los efectos de ghrelin dependientes de SIRT1, para lo cual en nuestro siguiente experimento utilizamos ratones *wt* y *p53 ko* a los cuales les administramos ghrelin i.c.v.

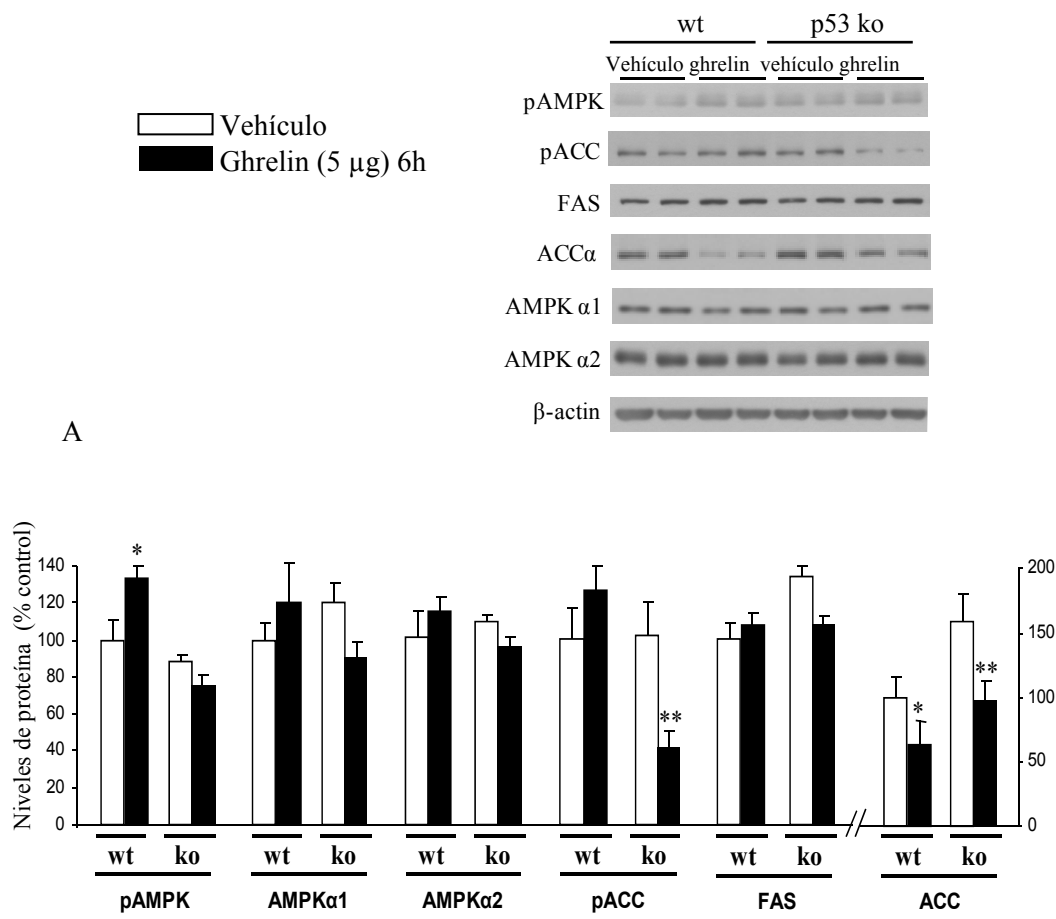


**Fig. 23:** Efecto de la administración ghrelin (5 ug) i.c.v. sobre la ingesta acumulada después de 2 horas (A) y 6 horas (B) en ratones *wt* y *p53 ko* machos (n=8/grupo) Siendo: \*p<0.05 en relación a sus controles.

En estos resultados observamos que la administración central de ghrelin aumentó la ingesta en ratones *wt* significativamente, pero no sucedió lo mismo con el grupo de los ratones *p53 ko* tratados con ghrelin i.c.v. después de 2 ni 6 horas (Figura 23). Estos resultados indicaban que la presencia del gen supresor de tumores *p53* era necesario para la acción orexigénica de ghrelin. Por lo tanto en un segundo experimento evaluamos los niveles hipotalámicos de las principales enzimas involucradas en el metabolismo de lípidos, las cuales son

RESULTADOS

afectadas por la vía ghrelin-SIRT1. Para este experimento partimos de los mismo grupos de ratones *wt* y *p53 ko* utilizados anteriormente.



**Fig. 24:** Efecto del tratamiento con ghrelin (5 ug) i.c.v. después de las 6 horas, sobre los niveles de enzimas involucradas en el metabolismo de lípidos (A y B) en hipotálamo de ratones *wt* y *p53 ko*. El análisis de proteínas se realizó a través de western Blotting, (n= 8/grupo). Siendo: \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  en relación a sus controles.

En estos resultados observamos que los niveles hipotalámicos de pAMPK aumentaron en los ratones *wt* debido al estímulo de ghrelin, pero este mismo efecto no se pudo observar en los ratones *p53 ko* (Figura 24). Este resultado sugiere que el gen supresor de tumores p53 es un mediador esencial de las acciones de ghrelin sobre AMPK.

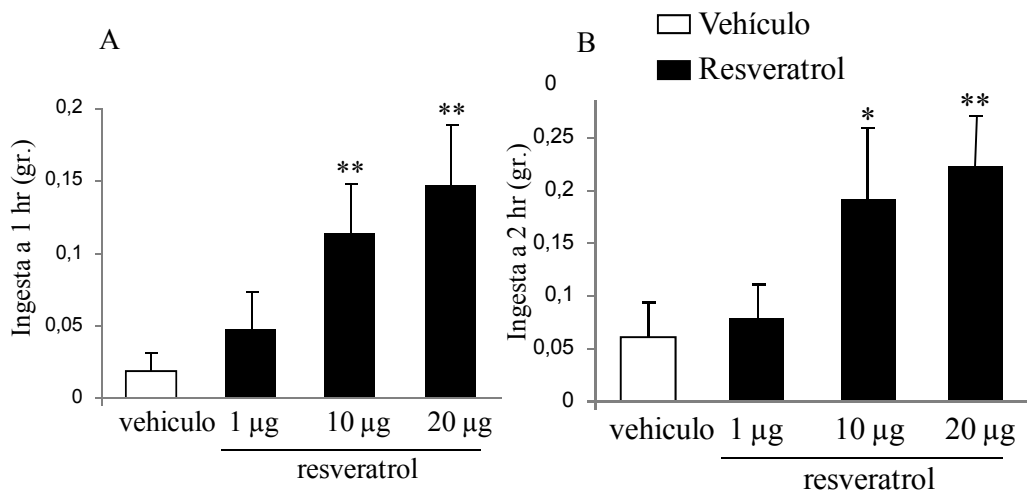
Por lo tanto con estos resultados podemos afirmar que p53 es un mediador a través de SIRT1, de las acciones orexigénicas de ghrelin.

*Efecto de la administración de Resveratrol sobre la ingesta y el metabolismo de ácidos grasos a nivel del hipotálamo de ratones p53 ko.*

Diversos trabajos científicos han demostrado que el Resveratrol, un polifenol que se encuentra en uvas y otros alimentos, activa a SIRT1 (Sinclair *et al*, 2003) y estimula a AMPK. (Yi CO, 2011; Patel MI, 2011; Vingtdoux V, 2010). Por lo tanto, evaluamos la hipótesis de que el Resveratrol podría afectar la ingesta de alimentos a través de sus efectos sobre el metabolismo de lípidos a nivel del hipotálamo.

Partimos de un primer experimento en el cual administramos centralmente Resveratrol a diferentes dosis (1 ug, 10 ug, 20 ug) a 1 hora y 2 horas a ratones *swiss*. En nuestros resultados pudimos observar que la inyección central de Resveratrol, incrementa la ingesta en ratones de manera dosis dependiente (1 µg, 10 µg, 20 µg) después de 1 y 2 horas. (Figura 25).

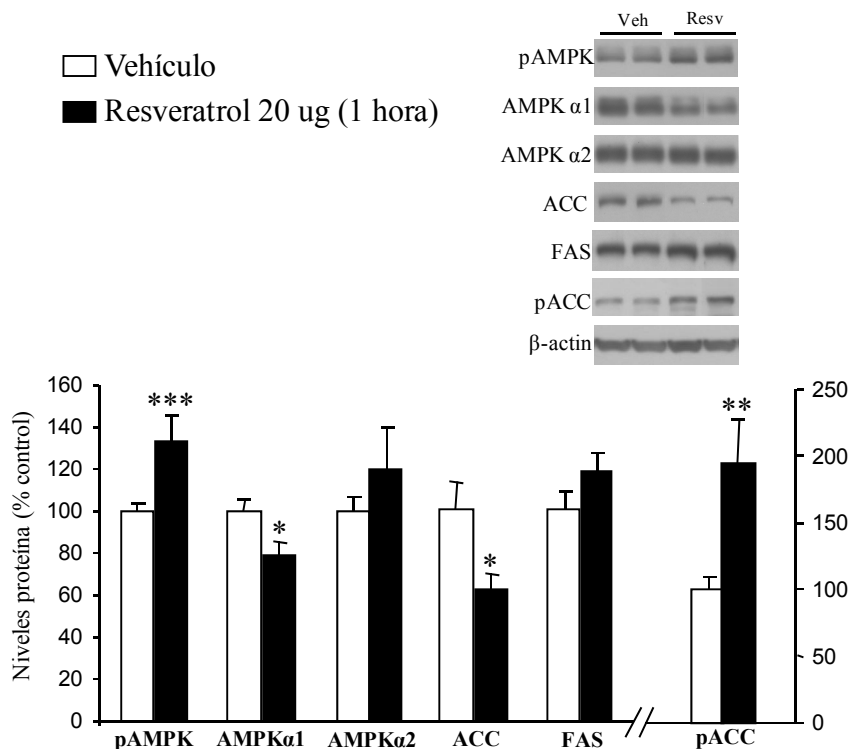
## RESULTADOS



**Fig. 25:** Efecto de la administración i.c.v. de Resveratrol dosis-respuesta (1, 10 y 20 ug) sobre la ingesta después de 1 hora (A) y 2 horas (B), en ratones *swiss*. (n=8/grupo). Siendo:  $p^*<0.05$ ,  $**p<0.01$  en relación a sus controles.

Con los resultados anteriores, y dado que observamos una respuesta dosis-dependiente de Resveratrol sobre la ingesta, en un segundo experimento evaluamos las enzimas involucradas en el metabolismo de lípidos a nivel del hipotálamo tras la administración central de Resveratrol (20 µg) después de 1 hora.



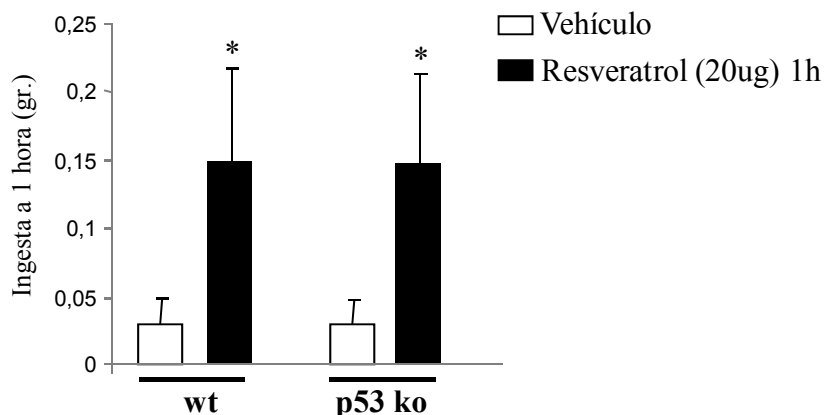


**Fig.26:** Efecto del tratamiento agudo con Resveratrol 20 ug i.c.v., después de 1 hora, sobre los niveles de proteínas involucradas en el metabolismo de lípidos en hipotálamo de ratones macho. El análisis de proteínas se realizó a través de *western Blotting*. (n=8/grupo). Siendo: \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$  en relación a sus controles.

En nuestros resultados observamos que posterior a 1 hora de la administración central de Resveratrol 20  $\mu$ g, los niveles de proteína de pAMPK y pACC, se incrementaron a nivel del hipotálamo (Figura 26). En nuestro siguiente experimento investigamos si p53 podría ser un mediador importante de las acciones de Resveratrol. Con este fin tratamos con Resveratrol i.c.v. a ratones *wt* y *p53 ko*, siguiendo el protocolo descrito anteriormente. La administración central de Resveratrol aumentó la ingesta de alimentos después de una hora,

## RESULTADOS

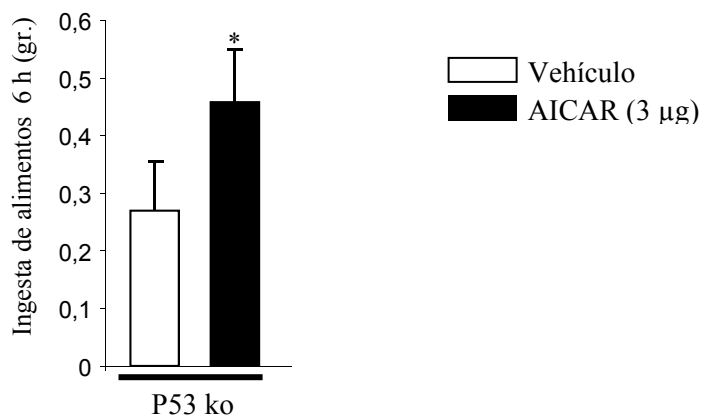
tanto en ratones *wt* y *p53 ko*, lo que sugiere que *p53* no actúa como mediador de la ingesta de alimentos inducida por Resveratrol (Figura 27).



**Fig. 27:** Efecto de Resveratrol 20  $\mu$ g i.c.v. sobre la ingesta de alimentos en ratones *wt* y *p53 ko* después de 1 hora. (n=8/grupo). \*P<0.05 en relación a sus controles.

### *Efectos de la administración de AICAR sobre la ingesta y el metabolismo de ácidos grasos en ratones p53 ko*

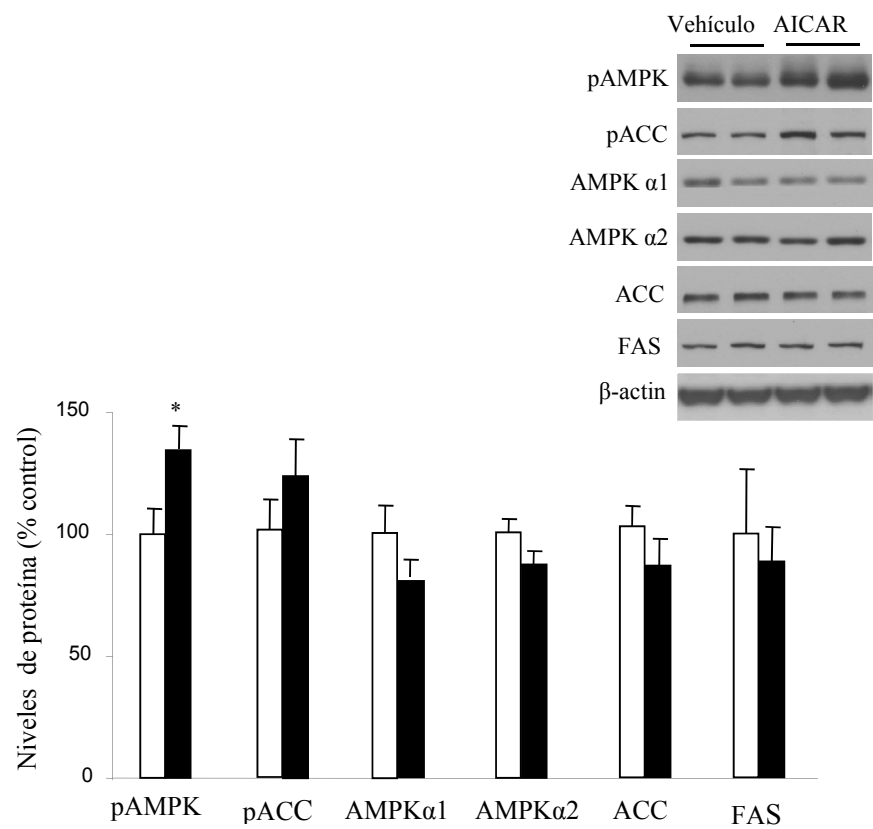
Como ya es sabido AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -D-ribofuranoside) es un activador ya caracterizado de AMPK (Giri *et al*, 2004) el cual al inyectarse centralmente, estimula la ingesta de alimentos. En el siguiente experimento evaluamos si *p53* es indispensable para la acción orexigénica de AICAR, para lo cual tratamos ratones *p53 ko* con AICAR i.c.v. 3  $\mu$ g. Lo que observamos es un aumento de la ingesta de alimentos a las 6 horas posterior a la inyección central de AICAR (Figura 28).



**Fig.28:** Efecto de AICAR 3 µg i.c.v. sobre la ingesta de alimentos en ratones *p53 ko* después de 6 horas. (n=8/grupo). \*P<0.05 en relación a sus controles.

Posteriormente también evaluamos las enzimas involucradas en el metabolismo de lípidos, y observamos un incremento en los niveles de pAMPK en ratones *p53 ko* tratados con AICAR, lo que nos indica que p53 no es indispensable para la acción orexigénica de AICAR, un potente estimulador de AMPK (Figura 29).

RESULTADOS



**Fig. 29:** Efecto de AICAR (3  $\mu$ g) i.c.v. sobre los niveles hipotalámicos de enzimas involucradas en el metabolismo de lípidos. El análisis se hizo por Western Blotting. (n=8/grupo) \*P<0.05 en relación a sus controles.

## DISCUSSION



## DISCUSION

---

La obesidad es un factor de riesgo para enfermedades como la diabetes tipo 2, enfermedades coronarias, hipertensión y diversos tipos de cáncer. La obesidad aumenta cuando la ingesta energética excede al gasto energético, y se refleja principalmente como un almacenamiento excesivo de triacilglicerolos. La obesidad es un estado complejo el cual depende del tipo de la dieta, el medio ambiente, edad, actividad física y factores genéticos (Friedman 2003).

Diversos trabajos científicos demuestran que el balance entre la ingesta de energía y el gasto energético se encuentra estrechamente regulado. Una red homeostática mantiene el almacenamiento de energía a través de interacciones complejas entre centros regulatorios de la alimentación en el sistema nervioso central (SNC) y señales periféricas provenientes de diversos tejidos como el tejido adiposo, hígado, músculo esquelético y otros (Cone, R.D. 2005; Sainsbury et al, 2002; Spiegelman and flier, 2001).

El núcleo arcuato y el núcleo paraventricular son parte de sistemas que relacionan la composición corporal con la ingesta de alimentos y el gasto energético. Estímulos aferentes neuronales (vagales) y estímulos hormonales (insulina, leptina, ghrelin, colecistocinina, glucocorticoides) influenciados por el estado metabólico son recibidos en el hipotálamo, modulando la liberación de péptidos que se sabe que afectan la ingesta de alimentos, a señales eferentes del eje hipotálamo hipófisis y al sistema nervioso autónomo (Leibowitz SF, 1995; Steffens AB, 1990).

La predisposición genética es otro factor contribuyente al desarrollo de la obesidad como lo demuestran estudios de agregación familiar, gemelos y estudios de adopción (Allison et al., 1996; Friedman, 2003; Stunkard et al.,

## DISCUSION

1990, O’Rahilly, 2003). Se estima que la base genética de las variaciones fenotípicas en la obesidad varía dentro de un rango del 40-70%. Por lo tanto, genes que codifican los componentes moleculares los sistemas regulatorios de la ingesta alimenticia y el gasto energético pueden ser la base para el desarrollo de la obesidad y enfermedades relacionadas a ella. El número de estudios que reportan asociaciones entre variaciones de secuencias de ADN en genes específicos y fenotipos de la obesidad en humanos, se ha incrementado considerablemente, con 426 hallazgos de positivas asociaciones con 127 genes candidatos (Rankinen Tuomo et al, 2006).

En base a las aseveraciones anteriores y a recientes estudios que relacionan a p53 con el metabolismo basal (Vousden K, 2009), nosotros decidimos estudiar el factor genético como una causa de la obesidad, por lo que utilizamos un modelo de ratón deficiente del gen p53.

Nuestros resultados demuestran que la administración de una dieta estándar a ratones carente del gen p53 (*p53 knockout*) no modifica las características fenotípicas de estos, como son el peso o la composición corporal o la ingesta de alimentos, ya que no encontramos diferencias significativas durante la administración de una dieta estándar durante 12 semanas, entre ratones *wildtype* y *p53 knockout*.

Por calorimetría indirecta evaluamos el gasto energético y actividad locomotora, y ambos grupos no mostraron diferencias significativas. Finalmente exploramos el efecto de la dieta estándar sobre el perfil glicémico en ambos grupos, sin encontrar diferencias en la glucosa basal en ayuno, ni en el test de tolerancia a la glucosa, así como tampoco en el test de tolerancia a la insulina. Por lo que con estos resultados podemos afirmar que la ausencia del gen p53, no es un factor



que afecte a la homeostasis energética y metabólica tras la administración de una dieta estándar.

Como se ha descrito anteriormente, dentro de los factores que influyen en la génesis de la obesidad, se encuentra el tipo de dieta. Las dietas altas en grasas desempeñan un papel determinante en el desarrollo de la obesidad así como en los cambios moleculares vistos en ella, por lo cual en nuestro siguiente experimento sometimos a los ratones *wildtype* y *p53 knockout* a dietas altas en grasas (HFD).

Observamos que al administrar una dieta alta en grasas, los ratones *p53 knockout* ganan menos peso que sus controles, un resultado que es independiente de la ingesta. Estos resultados sugieren que la ausencia del gen *p53* tiene acciones metabólicas importantes cuando los ratones son alimentados con una dieta alta en grasas.

Al valorar la composición corporal por RMN observamos que los ratones *p53 knockout* tienen menos masa grasa que sus controles, sin cambios en su masa magra. Dado que los ratones deficientes del gen *p53* presentan menor peso corporal que sus controles y una menor adiposidad, nuestro siguiente paso fue investigar la causa de la menor ganancia de peso en los ratones *p53 knockout*, y sabiendo que el peso es determinado por la ingesta y el gasto energético, evaluamos por calorimetría indirecta el gasto energético, la actividad locomotora y el cociente respiratorio ( $RQ = VCO_2/VO_2$ ) en ambos grupos de ratones. Encontramos que los ratones *p53 knockout* presentaban un mayor gasto energético, sin cambios en la actividad locomotora ni en el cociente respiratorio, en relación a sus controles, lo que nos sugiere que la menor ganancia de peso de los ratones *p53 knockout* alimentados con una dieta alta en grasa, se debe a un mayor gasto energético, el cual no se explica por la actividad física de estos

## DISCUSION

ratones. Por lo tanto en nuestros siguientes experimentos decidimos evaluar la termogénesis, que es otro factor que influye en el gasto energético.

Con este propósito evaluamos la expresión de diferentes genes y/o proteínas implicados en la activación del programa termogénico en el tejido adiposo marrón interescapular (BAT) (principal tejido involucrado en la termogénesis en los ratones). Encontramos evidencias que indican una mayor termogénesis en el BAT de los ratones *p53 knockout*, presentando mayores niveles de proteína UCP1 (proteína que desacopla la generación de ATP y disipa la energía como calor) junto con una mayor expresión a nivel de ARNm de UCP3 y  $\beta$ -AR2, lo que sugiere una mayor activación del sistema nervioso simpático en el BAT. Además, también encontramos mayores niveles de *prdm16*, un factor de transcripción que activa a UCP1.

Por lo tanto, a nivel molecular podríamos afirmar que el mayor gasto energético observado en los ratones *p53 knockout* alimentados con una dieta alta en grasa, se debe a una mayor activación del programa termogénico, utilizando la grasa proveniente de la dieta así como del tejido adiposo para generar calor. Otro dato interesante que observamos en el BAT de los ratones *p53 knockout*, fueron los niveles de CIDEA aumentados (una proteína involucrada en el metabolismo lipídico y cuya actividad parece ser contraria a la de UCP1 (Zhou et al, 2003)) probablemente se deba a la dieta alta en grasas que induce la expresión de CIDEA, por el depósito de grasas a nivel de BAT.

En base a los resultados anteriores, expusimos a ambos grupos de ratones a 4°C durante 5 horas (prueba aguda a la tolerancia al frío) y observamos que la temperatura corporal de los ratones *p53 knockout*, disminuía significativamente en relación a sus controles. Entonces podemos afirmar que los ratones *p53 knockout* durante la ingesta de dietas altas en grasas, presentan un fenotipo en el

cual ganan menos peso corporal y presentan menos masa grasa que sus controles, a expensas del aumento de la termogénesis, la cual directamente aumenta el gasto energético.

Para poder explicar la menor cantidad de masa grasa que presentan los ratones *p53 knockout*, decidimos también evaluar el metabolismo de lípidos en el tejido adiposo blanco (WAT). Encontramos niveles elevados de las enzimas involucradas en la lipogénesis ACC y FAS, así como de proteínas involucradas en la oxidación de ácidos grasos como CPT1 (proteína encargada de transportar los ácidos grasos para su oxidación) y una mayor expresión del receptor beta-adrenérgico tipo1 (sugiriéndonos un mayor tono simpático).

Estos datos demuestran que tanto la tasa de oxidación como la síntesis de ácidos grasos se encuentra incrementada en el WAT de los ratones *p53 knockout* sometidos a una dieta alta en grasas. Este dato apoya, junto con el mayor gasto energético, la menor cantidad de masa grasa encontrada en los ratones *p53 knockout*, con lo que podríamos afirmar que en ausencia del gen *p53*, el metabolismo basal se encuentra elevado tanto a nivel de WAT como a nivel de BAT.

Otro órgano involucrado en la captación, síntesis y liberación de ácidos grasos, es el hígado, siendo además uno de los órganos más afectados durante la ingesta de dietas altas en grasas. Al evaluar el metabolismo de lípidos a nivel hepático, en los ratones *p53 knockout*, no encontramos datos concluyentes que demostraran una mayor lipólisis o lipogénesis. Así, observamos niveles proteicos disminuidos de pAMPK, ACC $\alpha$  y FAS. Mientras, a nivel de expresión génica, no encontramos diferencias significativas en ACC $\alpha$ , FAS o PGC1.

## DISCUSION

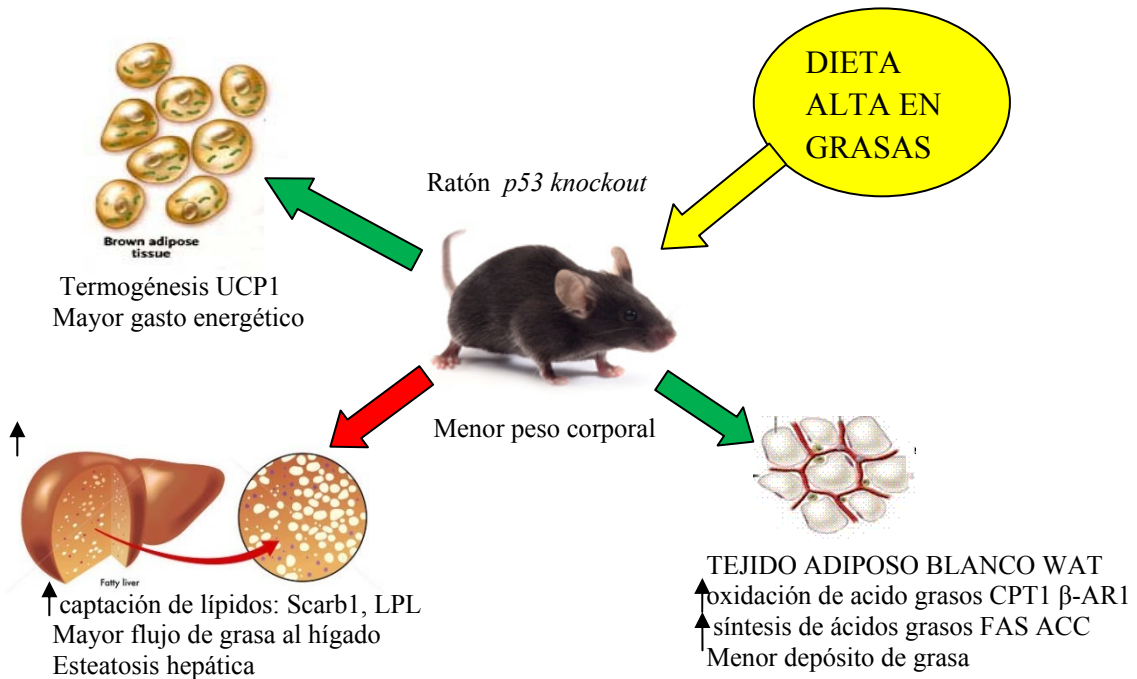
Sin embargo, interesantemente los niveles de Scarb1 (involucrada en la recaptación de lipoproteínas de alta densidad, HDL) y la expresión de LPL (involucrado en la hidrólisis y captación de TAG circulantes) se encontraron elevados significativamente en el hígado de ratones deficientes para p53, confirmando que la captación de ácidos grasos se encontraba aumentada a nivel hepático, tanto por parte de Scarb1 que capta los remanentes de grasa proveniente de las HDL así como por LPL que se encarga de captar e hidrolizar los triacilglicéridos provenientes de la dieta en forma de quilomicrones y los ácidos grasos provenientes del tejido adiposo.

En su conjunto, los hallazgos anteriores nos sugieren que la ausencia del gen p53 en condiciones de alto consumo de calorías en forma de grasa, actúa como un factor que produce un fenotipo delgado, a expensas del aumento de la termogénesis en BAT, aumentando el gasto energético y el metabolismo en WAT. Sin embargo, la ausencia de p53 también favorece una mayor captación de grasa por parte del hígado.

En concordancia con los resultados anteriores, a nivel hepático, encontramos menores niveles de ácidos grasos no esterificados (NEFAS) y mayores niveles hepáticos de triacilgliceroles en los ratones *p53 knockout*, sin diferencias significativas entre ambos grupos en las concentraciones de colesterol. Estos datos sugieren que en ausencia del gen p53, existe un mayor flujo del exceso de grasa hacia el hígado que hacia el WAT.

Finalmente y debido a la relación que existe entre la ingesta alta en grasas y la resistencia a insulina, evaluamos el perfil glicémico de ambos grupos. No encontramos diferencias en los niveles de glucosa basal en ayuno ni en el test de tolerancia a la glucosa (GTT) entre ambos grupos.

Sin embargo, en el test de tolerancia a la insulina (ITT) observamos que los ratones *p53 knockout* tienen menores niveles de glucosa, sugiriéndonos que existe un mayor sensibilidad a la insulina en estos ratones, dato que es respaldado por anteriores publicaciones donde la supresión de la actividad de *p53* mejoró la sensibilidad a la insulina en ratones (Minamino et al, 2009).



**Fig. 1:** Esquema que resume las características fenotípicas desarrolladas por los ratones *p53 knockout* durante la ingesta de dietas altas en grasas. Presentan un menor peso que los ratones *wt*, independiente de la ingesta, mayor termogénesis expresada por aumento de UCP1 en BAT, menor depósito de grasa a nivel de WAT y mayor captación de lípidos a nivel hepático, esteatosis hepática

## DISCUSION

### ***P53 y respuesta orexigénica de ghrelin***

El ghrelin es un péptido secretado mayoritariamente en el estómago y se considera la única hormona peptídica orexigénica de nuestro organismo. Se conoce que su mecanismo de acción es a través del receptor tipo 1 de la hormona del crecimiento (GHSR1), el cual se encuentra en una mayor densidad en el hipotálamo e hipófisis. Las neuronas del núcleo arcuato que expresan AgRP/NPY, son esenciales en el control de la conducta alimenticia y el peso corporal. Además, se sabe que la activación de las neuronas de NPY y AgRP en el ARC, median el efecto orexigénico de ghrelin (Nakazato, 1999; Bloom SR, 2000).

A nivel intracelular ghrelin incrementa la ingesta a través de la activación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) y la acetil CoA carboxilasa (ACC) y la inhibición de la sintasa de ácidos grasos (FAS). (Lopez M et al, 2008). Sin embargo, los mecanismo moleculares iniciados por la activación del receptor de ghrelin y que llevan a la activación de AMPK, no están claros. Nosotros postulamos que SIRT1, una desacetilasa dependiente de NAD<sup>+</sup>, podría estar involucrado en esta vía, mediando las acciones orexigénicas de ghrelin.

Nuestros resultados demuestran que el estado nutricional modifica la actividad de SIRT1 a nivel del hipotálamo en ratas, esto lo comprobamos por la disminución de los niveles de acetil-p53 (una diana de SIRT1) durante la privación de alimentos. Esta regulación de la actividad de SIRT1 a nivel del hipotálamo es similar a la regulación en otros tejidos periféricos (Cohen HY, 2004).

Por lo tanto, si conocemos que los niveles de ghrelin, al igual que la actividad de SIRT1, son regulados por el estado nutricional, y aumentan durante el ayuno

o privación de alimentos (Kirchner H, 2009, Cohen DE, 2009), nuestro siguiente paso fue administrar ghrelin a nivel central para comprobar su efecto sobre la actividad de SIRT1 en el hipotálamo.

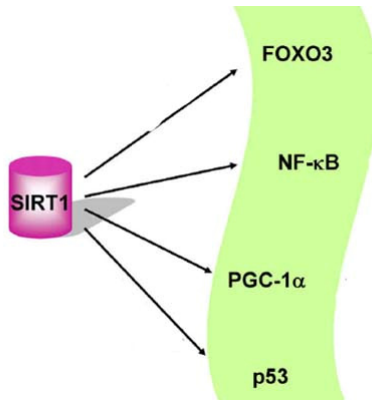
Consistente con nuestra hipótesis, nuestros hallazgos demuestran que la administración central de ghrelin, aumenta la actividad de SIRT1 a nivel del hipotálamo, disminuyendo los niveles de acetil-p53 tanto a las 2 horas como a las 6 horas de su administración.

Para confirmar los anteriores hallazgos que demuestran la relación entre SIRT1 y ghrelin, utilizamos el bloqueo farmacológico de SIRT1 junto a la administración central de ghrelin. Nuestros resultados demuestran que el bloqueo farmacológico de SIRT1 con EX527, disminuye significativamente los efectos orexigénicos de ghrelin a las 2 y 6 horas. A nivel molecular, el bloqueo farmacológico de SIRT1, altera los efectos de ghrelin sobre enzimas involucradas en el metabolismo de lípidos, disminuyendo notablemente los niveles hipotalámicos de pAMPK y ACC en el grupo al cual se le administró el inhibidor de SIRT1 (EX527) previamente a ghrelin. Estos resultados nos confirman que SIRT está mediando los efectos orexigénicos de ghrelin.

Encontramos también que el bloqueo farmacológico de SIRT1 disminuye los efectos de ghrelin sobre factores de transcripción como FOXO1 y PCREB y sobre los neuropéptidos AgRP y NPY. Estos mismos resultados fueron observados con el uso de sirtinol, otro inhibidor selectivo de SIRT1. SIRT1 es una desacetilasa dependiente de NAD<sup>+</sup>, que controla diversas vías metabólicas en tejido adiposo, hígado, páncreas y el músculo esquelético. Para ejercer sus acciones, el SIRT1 actúa desacetilando múltiples factores de transcripción,

## DISCUSION

como FOXO, NFκB, PGC1 y p53. p53 es una importante proteína supresora de tumores (Picard F, 2004; Rodgers JT, 2007; Bordone L, 2006).



**Fig. 2:** Esquema que muestra algunas dianas de SIRT1, dentro de estas encontramos p53, el cual es un supresor de tumores. SIRT1 es una desacetilasa dependiente de NAD<sup>+</sup> que se expresa en muchos tejidos incluyendo al hipotálamo.

Dado que nuestros resultados anteriores demuestran que el bloqueo farmacológico de SIRT1 disminuye significativamente el efecto de ghrelin sobre el metabolismo de lípidos a nivel del hipotálamo, nosotros postulamos que el efecto de ghrelin sobre SIRT1 podría estar mediado por p53. Con este propósito utilizamos un modelo de ratón deficiente para el gen p53 al cual administramos ghrelin centralmente.

Nuestros resultados demuestran que el efecto orexigénico de ghrelin disminuyó notablemente en los ratones *p53 knockout*, tanto a las 2 como a las 6 horas, sugiriendo que la presencia de p53 es necesaria para la actividad de ghrelin. Al igual que en la inhibición farmacológica de SIRT1, ghrelin fue incapaz de activar a AMPK en los ratones *p53 knockout*. Todos estos resultados nos

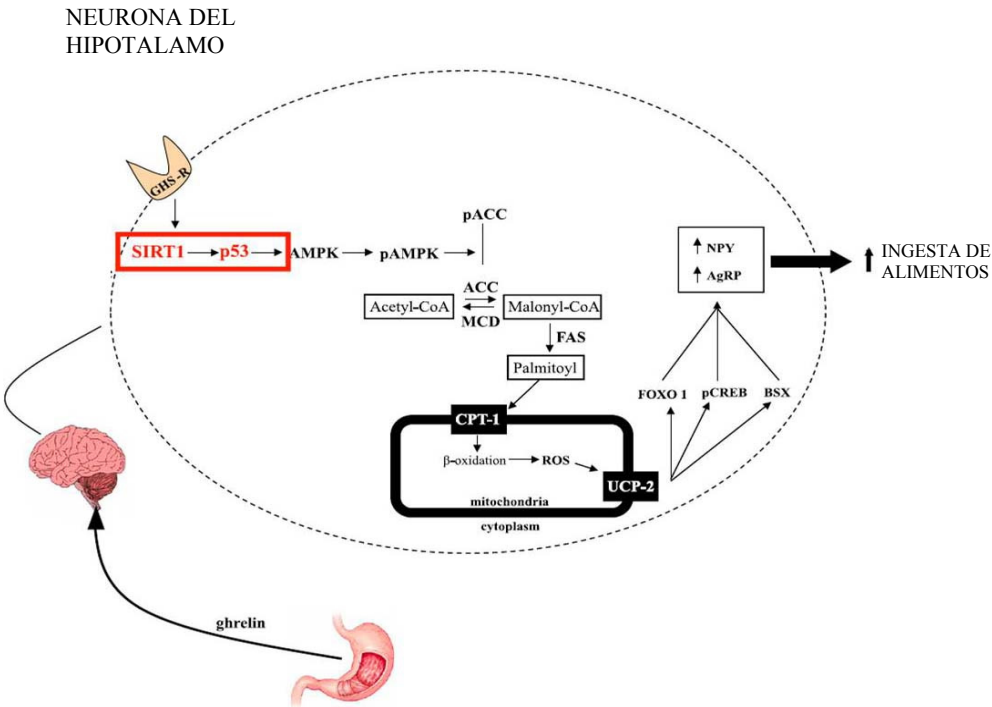


estaban demostrando que p53 es un mediador esencial de los efectos de ghrelin sobre AMPK dependientes de SIRT1.

Diversos trabajos científicos han demostrado la interacción entre SIRT1 y AMPK, y la activación directa de este último por diversos compuestos como Resveratrol y AICAR (Dasgupta B, 2007; Andersson U, 2004) pero con nuestros resultados demostramos que la vía SIRT1/p53 no es esencial para las acciones de los activadores directos de AMPK ya que tanto resveratrol como AICAR activaron la ingesta en ratones *p53 knockout*, y a AMPK.

En resumen, hemos descrito una nueva vía por medio de la cual ghrelin realiza sus acciones orexigénicas. Hemos demostrado que ghrelin a nivel central estimula la acción de SIRT1 sobre p53, lo cual es observado por la disminución de los niveles de acetil-p53. Estableciendo una nueva vía ghrelin SIRT1/p53 a nivel del hipotálamo, afirmación que es respaldada por el hecho que durante la inhibición farmacológica de SIRT1 o en la ausencia del gen p53, tanto las acciones orexigénicas de ghrelin, como el efecto de este sobre AMPK, se vieron abolidas notablemente, lo que también al final se puede observar por la disminución de los efectos de ghrelin sobre los factores de transcripción como pCREB, FoxO1, Bsx y los neuropéptidos AgRP/NPY.

DISCUSION



**Fig. 3:** Esquema que resume nuestro modelo para los mecanismos iniciados por la activación del receptor de ghrelin que conducen a la activación de AMPK y finalmente a un incremento de la conducta alimenticia. ROS, especies reactivas de oxígeno; CPT, catinipalmitoiltransferasa; UCP, proteína desacoplante.

## CONCLUSIONES



### CONCLUSIONES

1. En condiciones de dieta normal los animales con deficiencia del gen p53 no muestran alteraciones evidentes en la homeostasis energética.
2. En animales expuestos a dietas altas en grasa, la falta de p53 provoca un estado de resistencia en relación a la ganancia de peso y adiposidad.
3. El mecanismo orexigénico de ghrelin es dependiente de SIRT1 y p53.



## BIBLIOGRAFIA





**Abbott CR, Small CJ, Kennedy AR, Neary NM, Sajedi A, Ghatei MA, Bloom SR.** Blockade of the neuropeptide Y Y2 receptor with the specific antagonist BIIE0246 attenuates the effect of endogenous and exogenous peptide YY(3–36) on food intake. *Brain Res* 2005; 1043:139–144.

**Abe M, Saito M, Ikeda H, Shimazu T.** Increased neuropeptide Y content in the arcuato-paraventricular hypothalamic neuronal system in both insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetic rats. *Brain Res* 1991;539 :223–7.

**Adrian TE, Ferri GL, Bacarese-Hamilton AJ, Fuessl HS, Polak JM, Bloom SR.** Human distribution and release of a putative new gut hormone, peptide YY. *Gastroenterology* 1985; 89: 1070–1077.

**Adrian TE, Savage AP, Sagor GR, Allen JM, Bacarese-Hamilton AJ, Tatemoto K, Polak JM, Bloom SR.** Effect of peptide YY on gastric, pancreatic, and biliary function in humans. *Gastroenterology* 1985; 89:494–499.

**Ahima RS, Saper CB, Flier JS, Elmquist JK 2000** Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol* 21:263-307.

**Akabayashi A, Zaia CT, Silva I, Chae HJ, Leibowitz SF.** Neuropeptide Y in the arcuate nucleus is modulated by alterations in glucose utilization. *Brain Res* 1993; 621 :343–8.

**Alexander, A. et al.** ATM signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107, 4153–4158 (2010).

**Anderson, K. A. et al.** Hypothalamic CaMKK2 contributes to the regulation of energy balance. *Cell Metab.* 7, 377–388 (2008).

**Andrews ZB, Z.W. Liu, N. Wallingford, D.M. Erion, E. Borok, J.M. Friedman, M.H. Tschop, M. Shanabrough, G. Cline, G.I. Shulman, A. Coppola, X.B. Gao, T.L. Horvath, S. Diano,** UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals, *Nature* 454 (2008) 846–851.

**Angulo P, Lindor KD.** Non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2002 Feb;17 Suppl:S186-90.

## BIBLIOGRAFIA

**Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Suda M, Koh T, Natsui K, Toyooka S, Shirakami G, Usui T, Shimatsu A, Doi K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K.** Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:4753–4758.

**Arvat, E., Maccario, M., Di Vito, L., Broglio, F., Benso, A., Gottero, C., Papotti, M., Muccioli, G., Dieguez, C., Casanueva, F.F., Deghenghi, R., Camanni, F., Ghigo, E., 2001.** Endocrine activities of ghrelin, a natural growth hormone secretagogue (GHS), in humans: comparison and interactions with hexarelin, a nonnatural peptidyl GHS, and GH-releasing hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86 , 1169–1174.

**Asakawa A, Inui A, Yuzuriha H, Ueno N, Katsuura G, Fujimiya M, Fujino MA, Nijima A, Meguid MM, Kasuga M.** Characterization of the effects of pancreatic polypeptide in the regulation of energy balance. *Gastroenterology* 2003; 124: 1325–1336.

**Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, et al.** Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 1989; 244: 217–21.

**Banks WA, B.O. Burney, S.M. Robinson,** Effects of triglycerides, obesity, and starvation on ghrelin transport across the blood–brain barrier, *Peptides* 29 (2008) 2061–2065.

**Banks WA, M. Tschop, S.M. Robinson, M.L. Heiman,** Extent and direction of ghrelin transport across the blood-brain barrier is determined by its unique primary structure, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302 (2002) 822–827

**Barazzoni R, A. Bosutti, M. Stebel, M.R. Cattin, E. Roder, L. Visintin, L. Cattin, G. Biolo, Zanetti M, G. Guarnieri,** Ghrelin regulates mitochondrial-lipid metabolism gene expression and tissue fat distribution in liver and skeletal muscle, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 288 (2005) E228–E235.

**Bártek J, Bártková J, Vojtěšek B, Stasková Z, Rejthar A, Kovarik J, Lane DP.** Patterns of expression of the p53 tumour suppressor in human breast tissues and tumours in situ and in vitro. *Int J Cancer.* 1990 Nov 15; 46:839–44.

**Baskin DG, Breininger JF, Schwartz MW 2000** SOCS-3 expression in leptinsensitive neurons of the hypothalamus of fed and fasted rats. *Regul Pept* 92:9-15.

**Batterham RL, Cowley MA, Small CJ, Herzog H, Cohen MA, Dakin CL, Wren AM, Brynes AE, Low MJ, Ghatei MA, Cone RD, Bloom SR.** Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature* 2002; 418: 650–654.

**Beck B, N. Musse, A. Stricker-Krongrad,** Ghrelin, macronutrient intake and dietary preferences in long-evans rats, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292 (2002) 1031–1035.

**Beglinger C, Degen L, Matzinger D, D'Amato M, Drewe J.** Loxiglumide, a CCK-A receptor antagonist, stimulates calorie intake and hunger feelings in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001;280: R1149–R1154.

**Bence KK, Delibegovic M, Xue B, Gorgun CZ, Hotamisligil GS, Neel BG, Kahn BB 2006** Neuronal PTP1B regulates body weight, adiposity and leptin action. *Nat Med* 12:917-924.

**Benoit SC, Air EL, Coolen LM, Strauss R, Jackman A, Clegg DJ, et al.** The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. *J Neurosci* 2002; 22 : 9048–52.

**Bensaad K, Tsuruta A, Selak MA, Vidal MN, Nakano K, Bartrons R, Gottlieb E, Vousden KH.** TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell.* 2006; 126:107-120.

**Bensaad K, Vousden KH.** Savior and slayer: the two faces of p53. *Nat Med.* 2005 . Dec;11:1278-9.

**Bowen J, M. Noakes, C. Trenerry, P.M. Clifton,** Energy intake, ghrelin, and cholecystokinin after different carbohydrate and protein preloads in overweight men, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91 (2006) 1477–1483.

**Broberger C, de Lecea L, Sutcliffe JG, Hokfelt T.** Hypocretin/orexin and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems. *J Comp Neurol* 1998; 402:460–74.

## BIBLIOGRAFIA

**Broberger C, Johansen J, Johansson C, Schalling M, Hokfelt T.** The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95 :15043–8.

**Broberger C.** Hypothalamic cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) neurons: histochemical relationship to thyrotropin-releasing hormone, melanin-concentrating hormone, orexin/hypocretin and neuropeptide Y. *Brain Res* 1999; 848 :101–13.

**Broglia F, E. Arvat, A. Benso, C. Gottero, G. Muccioli, M. Papotti, A.J. van der Lely, R. Deghenghi, E. Ghigo,** Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86 (2001) 5083–5086

**Budanov, A. V. & Karin, M.** p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell* 134, 451–460 (2008).

**Callahan HS, Cummings DE, Pepe MS, Breen PA, Matthys CC, Weigle DS** 2004 Postprandial suppression of plasma ghrelin level is proportional to ingested caloric load but does not predict intermeal interval in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 89:1319-1324

**Chelikani PK, Haver AC, Reeve JR, Jr., Keire DA, Reidelberger RD. Daily,** intermittent intravenous infusion of peptide YY(3–36) reduces daily food intake and adiposity in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006; 290: R298–R305.

**Chen C, D. Wu, I.J. Clarke,** Signal transduction systems employed by synthetic GH-releasing peptides in somatotrophs, *J. Endocrinol.* 148 (1996) 381–386.

**Chen P, Li C, Haskell-Luevano C, Cone RD, Smith MS.** Altered expression of agouti-related protein and its colocalization with neuropeptide Y in the arcuate nucleus of the hypothalamus during lactation. *Endocrinology* 1999; 140:2645–50.

**Cheung CC, Clifton DK, Steiner RA.** Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology* 1997;138(10):4489–92. Marsh DJ, Weingarh DT, Novi DE, Chen HY, Trumbauer ME, Chen AS, et al. Melanin-concentrating hormone 1 receptor-

deficient mice are lean, hyperactive, and hyperphagic and have altered metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:3240–5.

**Cheung CC, Clifton DK, Steiner RA.** Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology* 1997;138:4489–92.

**Chua SC, Jr., Koutras IK, Han L, Liu SM, Kay J, Young SJ, Chung WK, Leibel RL 1997** Fine structure of the murine leptin receptor gene: splice site suppression is required to form two alternatively spliced transcripts. *Genomics* 45:264-270

**Claret, M. et al.** AMPK is essential for energy homeostasis regulation and glucose sensing by POMC and AgRP neurons. *J. Clin. Invest.* 117, 2325–2336 (2007).

**Clark JT, Kalra PS, Crowley WR, Kalra SP.** Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats. *Endocrinology* 1984; 115: 427–429.

**Coleman DL 1973** Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. *Diabetologia* 9:294-298

**Coleman DL 1979** Obesity genes: beneficial effects in heterozygous mice. *Science* 203:663-665

**Coppari R.** Metabolic actions of hypothalamic SIRT1. *Trends Endocrinol Metab.* 2012 Apr;23(4):179-85.

**Cota D, Proulx K, Smith KA, Kozma SC, Thomas G, Woods SC, Seeley RJ 2006** Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science* 312:927-930

**Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdan MG, Diano S, Horvath TL, et al.** Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 2001; 411:480–4.

**Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdan MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD, Low MJ 2001** Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 411:480-484.

## BIBLIOGRAFIA

**Cowley MA, Smith RG, Diano S, Tschop M, Pronchuk N, Grove KL, et al.** The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 2003; 37 :649–61.

**Cummings DE, D.S. Weigle, R.S. Frayo, P.A. Breen, M.K. Ma, E.P. Dellinger, J.Q. Purnell,** Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery, *New Engl. J. Med.* 346 (2002) 1623–1630.

**Cummings DE, Frayo RS, Marmonier C, Aubert R, Chapelot D 2004** Plasma ghrelin levels and hunger scores in humans initiating meals voluntarily without time- and food-related cues. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287:E297-E304.

**Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M.** Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 2000; 141: 4255–4261.

**Deysher, A.R. Waxman, R.D. White, T.D. Williams, J.L. Lachey, R.J. Seeley, B.B. Lowell, J.K. Elmquist,** Mice lacking ghrelin receptors resist the development of diet-induced obesity, *J. Clin. Invest.* 115 (2005) 3564–3572.

**Dhibi M, Brahmi F, Mnari A, Houas Z, Chargui I, Bchir L, Gazzah N, Alsaif MA, Hammami M.** The intake of high fat diet with different trans fatty acid levels differentially induces oxidative stress and non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in rats. *Nutr Metab (Lond)*. 2011 Sep 23;8:65.

**Dietrich MO, Antunes C, Geliang G, Liu ZW, Borok E, Nie Y, Xu AW, Souza DO, Gao Q, Diano S, Gao XB, Horvath TL.** Agrp neurons mediate Sirt1's action on the melanocortin system and energy balance: roles for Sirt1 in neuronal firing and synaptic plasticity. *J Neurosci*. 2010 Sep 1; 30 :11815-25.

**Dockray GJ.** Peptides of the gut and brain: the cholecystokinins. *Proc Nutr Soc* 1987; 46:119–124.

**Dornonville de la Cour C, Bjorkqvist M, Sandvik AK, Bakke I, Zhao CM, Chen D, Hakanson R.** A-like cells in the rat stomach contain ghrelin and do not operate under gastrin control. *Regul Pept* 2001; 99:141–150.

**Douglass J, McKinzie AA, Couceyro P.** PCR differential display identifies a rat brain mRNA that is transcriptionally regulated by cocaine and amphetamine. *J Neurosci* 1995; 15 :2471–81.

**Douglass J, McKinzie AA, Couceyro P.** PCR differential display identifies a rat brain mRNA that is transcriptionally regulated by cocaine and amphetamine. *J Neurosci* 1995; 15 :2471–81.

**Elias CF, Aschkenasi C, Lee C, Kelly J, Ahima RS, Bjorbaek C, et al.** Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron* 1999; 23 :775–86.

**Elias CF, Lee C, Kelly J, Aschkenasi C, Ahima RS, Couceyro PR, et al.** Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron* 1998;21 :1375–85.

**Elias CF, Saper CB, Maratos-Flier E, Tritos NA, Lee C, Kelly J, et al.** Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *J Comp Neurol* 1998; 402:442–59.

**Elmqvist JK 1998** CNS regulation of energy balance and body weight: insights from rodent models. *Lab Anim Sci* 48:630-637

**F.A. Momany, C.Y. Bowers, G.A. Reynolds, D. Chang, A. Hong, K. Newlander,** Design, synthesis, and biological activity of peptides which release growth hormone in vitro, *Endocrinology* 108 (1981) 31–39.

**Farooqui JZ, Medrano EE, Abdel-Malek Z, Nordlund J.** The expression of proopiomelanocortin and various POMC-derived peptides in mouse and human skin. *Ann N Y Acad Sci.* 1993 May 31;680:508-10.

**Feng, Z. et al.** The regulation of AMPK  $\beta$ 1, TSC2, and PTEN expression by p53: stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1–AKT–mTOR pathways. *Cancer Res.* 67, 3043–3053 (2007).

**Feng, Z., Zhang, H., Levine, A. J. & Jin, S.** The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 102, 8204–8209 (2005).

## BIBLIOGRAFIA

**Fogarty, S. et al.** Calmodulin-dependent protein kinase kinase- $\beta$  activates AMPK without forming a stable complex — synergistic effects of Ca<sup>2+</sup> and AMP. *Biochem. J.* 426, 109–118 (2010).

**Foster-Schubert KE, J. Overduin, C.E. Prudom, J. Liu, H.S. Callahan, B.D. Gaylinn, M.O. Thorner, D.E. Cummings,** Acyl and total ghrelin are suppressed strongly by ingested proteins, weakly by lipids, and biphasically by carbohydrates, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93 (2008) 1971–1979.

**Friedman JM.** A war on obesity, not the obese. *Science.* 2003 Feb 7;299:856–8.

**Fulco, Sartorelli V.,** Comparing and Contrasting the Roles of AMPK and SIRT1 in Metabolic Tissues *Marcella; Cell Cycle.*; 7: 3669–3679, 2008

**Garcia JM, Polvino WJ.** Effect on body weight and safety of RC-1291, a novel, orally available ghrelin mimetic and growth hormone secretagogue: results of a phase I, randomized, placebo-controlled, multiple-dose study in healthy volunteers. *Oncologist* 2007 May;12(5):594–600

**Gibbs J, Young RC, Smith GP.** Cholecystokinin decreases food intake in rats. *J Comp Physiol Psychol* 1973; 84: 488–495.

**Gomori A, Ishihara A, Ito M, Mashiko S, Matsushita H, Yumoto M, et al.** Chronic intracerebroventricular infusion of MCH causes obesity in mice. Melanin-concentrating hormone. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 284:E583–8.

**Gooley JJ, Schomer A, Saper CB 2006** The dorsomedial hypothalamic nucleus is critical for the expression of food-entrainable circadian rhythms. *Nat Neurosci* 9:398–407.

**Graham M, Shutter JR, Sarmiento U, Sarosi I, Stark KL.** Overexpression of Agrt leads to obesity in transgenic mice. *Nat Genet* 1997; 17 :273–4.

**Gropp E, M. Shanabrough, E. Borok, A.W. Xu, R. Janoschek, T. Buch, L. Plum, N. Balthasar, B. Hampel, A. Waisman, G.S. Barsh, T.L. Horvath, J.C. Bruning,** Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding, *Nat. Neurosci.* 8 (2005) 1289–1291.



**Guan XM, Yu H, Palyha OC, McKee KK, Feighner SD, Sirinathsinghji DJ, et al.** Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res* 1997; 48:23–9.

**Guarente L, Picard F.** Calorie restriction the SIR2 connection. *Cell*. 2005 Feb 25; 120 : 473-82.

**Gundlach AL 2002** Galanin/GALP and galanin receptors: role in central control of feeding, body weight/obesity and reproduction? *Eur J Pharmacol* 440:255-268

**Hagan MM, Rushing PA, Pritchard LM, Schwartz MW, Strack AM, Van Der Ploeg LH, et al.** Long-term orexigenic effects of AgRP-(83–132) involve mechanisms other than melanocortin receptor blockade. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000; 279 :R47–52.

**Hagemann, D., Meier, J.J., Gallwitz, B., Schmidt, W.E., 2003.** Appetite regulation by ghrelin: a novel neuro-endocrine gastric peptide hormone in the gut-brain-axis. *Z. Gastroenterol.* 41, 929–936.

**Han MK, Song EK, Guo Y, Ou X, Mantel C, Broxmeyer HE.** SIRT1 regulates apoptosis and Nanog expression in mouse embryonic stem cells by controlling p53 subcellular localization. *Cell Stem Cell*. 2008 Mar 6; 2 :241-51.

**Harrold JA, T. Dovey, X.J. Cai, J.C. Halford, J. Pinkney,** Autoradiographic analysis of ghrelin receptors in the rat hypothalamus, *Brain Res.* 1196 (2008) 59–64.

**Haskell-Luevano, C., Chen, P., Li, C., Chang, K., Smith, M.S., Cameron, J.L., Cone, R.D., 1999.** Characterization of the neuroanatomical distribution of agouti-related protein immunoreactivity in the rhesus monkey and the rat. *Endocrinology* 140, 1408–1415.

**Hawley, S. A. et al.** Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD $\alpha/\beta$  and MO25 $\alpha/\beta$  are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J. Biol.* 2, 28 (2003).

**Hervieu GJ, Cluderay JE, Harrison D, Meakin J, Maycox P, Nasir S, et al.** The distribution of the mRNA and protein products of the melanin-

## BIBLIOGRAFIA

concentrating hormone (MCH) receptor gene, *slc-1*, in the central nervous system of the rat. *Eur J Neurosci* 2000; 12:1194–216.

**Heymsfield SB, Greenberg AS, Fujioka K, Dixon RM, Kushner R, Hunt T, Lubina JA, Patane J, Self B, Hunt P, McCamish M 1999** Recombinant leptin for weight loss in obese and lean adults: a randomized, controlled, dose-escalation trial. *JAMA* 282:1568-1575.

**Hill JO, Melanson EL, Wyatt HT.** Dietary fat intake and regulation of energy balance: implications for obesity. *J Nutr.* 2000 Feb; 130 :284S-288S.

**H, M. Kojima, T. Mizushima, S. Shimizu, K. Kangawa,** Structural divergence of human ghrelin. Identification of multiple ghrelin-derived molecules produced by post-translational processing, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 64–70.

**Howard AD, S.D. Feighner, D.F. Cully, J.P. Arena, P.A. Liberators, C.I. Rosenblum, M. Hamelin, D.L. Hreniuk, O.C. Palyha, J. Anderson, P.S. Parass, C. Diaz, M. Chou, K.K. Liu, K.K. McKee, S.S. Pong, L.Y. Chaung, A. Elbrecht, M. Dashkevich, R. Heavens, M. Rigby, D.J. Sirinathsinghji, D.C. Dean, D.G. Melillo, A.A. Patchett, R. Nargund, P.R. Griffin, J.A. DeMartino, S.K. Gupta, J.M. Schaeffer, R.G. Smith, L.H. Van der Ploeg,** A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release, *Science* 273 (1996) 974–977.

**Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, et al.** Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 425:191–6. 2003.

**Hung CC, Farooqi IS, Ong K, Luan J, Keogh JM, Pembrey M, Yeo GS, Dunger, Wareham NJ, O' Rahilly S.** Contribution of variants in the small heterodimer partner gene to birthweight, adiposity, and insulin levels: mutational analysis and association studies in multiple populations. *Diabetes.* 2003 May;52):1288-91.

**Irani BG, Le FC, Dunn-Meynell A, Levin BE 2008** Effects of leptin on rat ventromedial hypothalamic neurons. *Endocrinology* 149:5146-5154

**Ito, A., Lai, C.H., Zhao, X., Saito, S., Hamilton, M.H., Appella, E., and Yao, T.P. (2001).** p300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly

induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2. *EMBO J* 20, 1331–1340.

**J.Q. Purnell, D. Cummings, D.S. Weigle**, Changes in 24-h area-under-the-curve ghrelin values following diet-induced weight loss are associated with loss of fat-free mass, but not with changes in fat mass, insulin levels or insulin sensitivity, *Int. J. Obes. (London)* 31 (2007) 385–389.

**Jeanrenaud B, Rohner-Jeanrenaud F**. Effects of neuropeptides and leptin on nutrient partitioning: dysregulations in obesity. *Annu Rev Med* 2001; 52:339–51.

**Jéquier E**. Pathways to obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2002 Sep;26 Suppl 2:S12-7.

**Ji, C. et al.** Exogenous cell-permeable C6 ceramide sensitizes multiple cancer cell lines to doxorubicin-induced apoptosis by promoting AMPK activation and mTORC1 inhibition. *Oncogene* 29, 6557–6568 (2010).

**Kajimura S, Seale P, Spiegelman BM**. Transcriptional control of brown fat development. *Cell Metab.* 2010 Apr 7;11(4):257-62.

**Kawano H, Honma S, Honma A, Horie M, Kawano Y, Hayashi S**. Melanin-concentrating hormone neuron system: the Wide Web that controls the feeding. *Anat Sci Int* 2002; 77:149–60.

**Klingenberg M, Echtay KS, Bienengraeber M, Winkler E, Huang SG**. Structure-function relationship in UCP1. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1999 Jun;23 Suppl 6:S24-9.

**Kohno D, H.Z. Gao, S. Muroya, S. Kikuyama, T. Yada**, Ghrelin directly interacts with neuropeptide-Y-containing neurons in the rat arcuate nucleus: Ca<sup>2+</sup> signaling via protein kinase A and N-type channel-dependent mechanisms and cross-talk with leptin and orexin, *Diabetes* 52 (2003) 948–956.

**Kojima M, K. Kangawa**, Ghrelin: structure and function, *Physiol. Rev.* 85 (2005) 495–522.

## BIBLIOGRAFIA

**Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H., Kangawa, K., 1999.** Ghrelin is a growth-hormone releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402, 656–660.

**Kondoh H, Lleonart ME, Gil J, Wang J, Degan P, Peters G, Martinez D, Carnero A, Beach D (2005)** Glycolytic enzymes can modulate cellular life span. *Cancer Res* 65:177–185

**Kong WM, Stanley S, Gardiner J, Abbott C, Murphy K, Seth A, et al.** A role for arcuate cocaine and amphetamine-regulated transcript in hyperphagia, thermogenesis, and cold adaptation. *FASEB J* 2003; 17 :1688–90.

**Korbonits M, S.A. Bustin, M. Kojima, S. Jordan, E.F. Adams, D.G. Lowe, K. Kangawa, A.B. Grossman,** The expression of the growth hormone secretagogue receptor ligand ghrelin in normal and abnormal human pituitary and other neuroendocrine tumors, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86 (2001) 881–887.

**Koylu EO, Couceyro PR, Lambert PD, Ling NC, DeSouza EB, Kuhar MJ.** Immunohistochemical localization of novel CART peptides in rat hypothalamus, pituitary and adrenal gland. *J Neuroendocrinol* 1997; 9 :823–33.

**Kruse, J.P., and Gu, W. (2009).** Modes of p53 regulation. *Cell* 137, 609–622.

**Lambert PD, Couceyro PR, McGirr KM, Dall Vechia SE, Smith Y, Kuhar MJ.** CART peptides in the central control of feeding and interactions with neuropeptide Y. *Synapse* 1998; 29 :293–8.

**Larhammar D.** Structural diversity of receptors for neuropeptido Y, peptide YY and pancreatic polypeptide. *Regul Pept* 1996; 65: 165–174.

**Larsen PJ, Vrang N, Petersen PC, Kristensen P.** Chronic intracerebroventricular administration of recombinant CART(42–89) peptide inhibits and causes weight loss in lean and obese Zucker (fa/fa) rats. *Obes Res* 2000; 8 :590–6.

**Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, Friedman JM 1996** Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 379:632- 635

**Leibel, R.L., Chung, W.K., Chua, S.C., 1997.** The molecular genetics of rodent single gene obesities. *J. Biol. Chem.* 272, 31937–31940.

**Li, Y. et al.** AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice. *Cell Metab.* 13, 376–388 (2011)

**Lieberman, G.S., Rubinfeld, H., Glick, M., Kronfeld-Schor, N., Shimon, I., 2006.** Melanin-concentrating hormone stimulates human growth hormone secretion: a novel effect of MCH on the hypothalamic-pituitary axis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 290, E982–E988.

**Liu H, Kishi T, Roseberry AG, Cai X, Lee CE, Montez JM, et al.** Transgenic mice expressing green fluorescent protein under the control of the melanocortin-4 receptor promoter. *J Neurosci* 2003; 23 :7143–54.

**Lomb DJ, et al.,** Sirtuins regulate key aspects of lipid metabolism, *Biochim. Biophys. Acta*:1804:1652-1657, 2010

**Lopez M, R. Lage, A.K. Saha, D. Perez-Tilve, M.J. Vazquez, L. Varela, S. Sangiao-Alvarellos, S. Tovar, K. Raghay, S. Rodriguez-Cuenca, R.M. Deoliveira, T. Castaneda, R. Datta, J.Z. Dong, M. Culler, M.W. Sleeman, C.V. Alvarez, R. Gallego, C.J. Lelliott, D. Carling, M.H. Tschop, C. Dieguez, A. Vidal-Puig,** Hypothalamic fatty acid metabolism mediates the orexigenic action of ghrelin, *Cell Metab.* 7 (2008) 389–399.

Lopez M, Seoane L, Garcia MC, Lago F, Casanueva FF, Senaris R, Dieguez C 2000 Leptin regulation of prepro-orexin and orexin receptor mRNA levels in the hypothalamus. *Biochem Biophys Res Commun* 269:41-45

**López M, Varela L, Vázquez MJ, Rodríguez-Cuenca S, González CR, Velagapudi VR, Morgan DA, Schoenmakers E, Agassandian K, Lage R, Martínez de Morentin PB, Tovar S, Nogueiras R, Carling D, Lelliott C, Gallego R, Oresic M, Chatterjee K, Saha AK, Rahmouni K, Diéguez C, Vidal-Puig A.** Hypothalamic AMPK and fatty acid metabolism mediate thyroid regulation of energy balance. *Nat Med.* 2010 Sep;16(9):1001-8

**Luquet S, F.A. Perez, T.S. Hnasko, R.D. Palmiter,** NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates, *Science* 310 (2005) 683–685.

## BIBLIOGRAFIA

**Lynch RM, Tompkins LS, Brooks HL, Dunn-Meynell AA, Levin BE.** Localization of glucokinase gene expression in the rat brain. *Diabetes* 2000; 49 :693–700.

**Madeddu C, G. Mantovani,** An update on promising agents for the treatment of cancer cachexia, *Curr. Opin. Support. Palliat. Care* (2009) Dec; 3(4):258-62.

**Marsh DJ, Hollopeter G, Huszar D, Laufer R, Yagaloff KA, Fisher SL, et al.** Response of melanocortin-4 receptor-deficient mice to anorectic and orexigenic peptides. *Nat Genet* 1999; 21 :119–22

**Martinez JA, Moreno B, Martinez-Gonzalez MA.** Prevalence of obesity in Spain. *Obes Rev*, 5: 171-2. 2004.

**Matoba S, Kang J-G, Patino WD, Wragg A, Boehm M, Gavrilova O, Hurley PJ, Bunz F, Hwang PM (2006)** p53 regulates mitochondrial respiration. *Science* 312:1650–1653

**Matson CA, Reid DF, Cannon TA, Ritter RC.** Cholecystokinin and leptin act synergistically to reduce body weight. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000;278: R882–R890.

**McCowen KC, Maykel JA, Bistrian BR, Ling PR 2002** Circulating ghrelin concentrations are lowered by intravenous glucose or hyperinsulinemic euglycemic conditions in rodents. *J Endocrinol* 175:R7-11.

**McCrimmon, R. J. et al.** Key role for AMP-activated protein kinase in the ventromedial hypothalamus in regulating counterregulatory hormone responses to acute hypoglycemia. *Diabetes* 57, 444–450 (2008).

**McKee KK, O.C. Palyha, S.D. Feighner, D.L. Hreniuk, C.P. Tan, M.S. Phillips, R.G. Smith, L.H. Van der Ploeg, A.D. Howard,** Molecular analysis of rat pituitary and hypothalamic growth hormone secretagogue receptors, *Mol. Endocrinol.* 11 (1997) 415–423.

**McLaughlin CL, Baile CA, Buonomo FC.** Effect of CCK antibodies on food intake and weight gain in Zucker rats. *Physiol Behav* 1985;34:277–282.

**Meereis-Schwanke K, Klonowski-Stumpe H, Herberg L, Niederau C.** Long-term effects of CCK-agonist and -antagonist on food intake and body weight in Zucker lean and obese rats. *Peptides*. 1998;19(2):291-9

**Merrill, G.M., Kurth, E., Hardie, D. G. & Winder, W. W.** AICAR decreases malonyl-CoA and increases fatty acid oxidation in skeletal muscle of the rat. *Am. J. Physiol.* 273, E1107–E1112 (1997).

**Minamino T, Orimo M, Shimizu I, Kunieda T, Yokoyama M, Ito T, Nojima A, Nabetani A, Oike Y, Matsubara H, Ishikawa F, Komuro I.** A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nat Med*. 2009 Sep;15:1082-7.

**Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Muller C, Carling D, Kahn BB 2002** Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 415:339-343.

**Minokoshi, Y. et al.** AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 428, 569–574 (2004).

**Mizuno TM, Mobbs CV.** Hypothalamic agouti-related protein messenger ribonucleic acid is inhibited by leptin and stimulated by fasting. *Endocrinology* 1999; 140:814–7.

**Moran TH.** Cholecystokinin and satiety: current perspectives. *Nutrition* 2000; 16: 858–865.

**Mountjoy KG, Mortrud MT, Low MJ, Simerly RB, Cone RD.** Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol Endocrinol* 1994; 8 :1298–308

**N.M. Thompson, D.A. Gill, R. Davies, N. Loveridge, P.A. Houston, I.C. Robinson, T. Wells,** Ghrelin and des-octanoyl ghrelin promote adipogenesis directly in vivo by a mechanism independent of the type 1a growth hormone secretagogue receptor, *Endocrinology* 145 (2004) 234–242.

**Narkar, V. A. et al.** AMPK and PPAR $\delta$  agonists are exercise mimetics. *Cell* 134, 405–415 (2008).

## BIBLIOGRAFIA

**Neary NM, Goldstone AP, Bloom SR.** Appetite regulation: from the gut to the hypothalamus. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2004 Feb;60(2):153-60.

**Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, et al.** Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 1989; 342: 705–08.

**Niswender KD, Morrison CD, Clegg DJ, Olson R, Baskin DG, Myers MG, Jr., Seeley RJ, Schwartz MW 2003** Insulin activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the hypothalamic arcuate nucleus: a key mediator of insulin-induced anorexia. *Diabetes* 52:227-231

**Niswender KD, Morton GJ, Stearns WH, Rhodes CJ, Myers MG, Jr., Schwartz MW 2001** Intracellular signalling. Key enzyme in leptin-induced anorexia. *Nature* 413:794-795

**Nogueiras R, Williams LM, Dieguez C. Ghrelin:** new molecular pathways modulating appetite and adiposity. *Obes Facts*. 2010 Oct; 3:285-92.

**Obici S, Feng Z, Tan J, Liu L, Karkanias G, Rossetti L.** Central melanocortin receptors regulate insulin action. *J Clin Invest* 2001; 108 :1079–85.

**Olivier M, Taniere P.** Somatic mutations in cancer prognosis and prediction: lessons from TP53 and EGFR genes. *Curr Opin Oncol*. 2010 Jan; 23:88-92.

**Ollmann MM, Wilson BD, Yang YK, Kerns JA, Chen Y, Gantz I, et al.** Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* 1997; 278 :135–8.

**Pang, T. et al.** Conserved  $\alpha$ -helix acts as autoinhibitory sequence in AMP-activated protein kinase  $\alpha$  subunits. *J. Biol. Chem.* 282, 495–506 (2007). 21. Chen, L. et al. Structural insight into the autoinhibition mechanism of AMP-activated protein kinase. *Nature* 459,1146–1149 (2009).

**Patel MI, Gupta A, Dey CS.** Potentiation of neuronal insulin signaling and glucose uptake by resveratrol: the involvement of AMPK. *Pharmacol Rep*. 2011;63(5):1162-8.



**Pereira-da-Silva M, Torsoni MA, Nourani HV, Augusto VD, Souza CT, Gasparetti AL, et al.** Hypothalamic melanin-concentrating hormone is induced by cold exposure and participates in the control of energy expenditure in rats. *Endocrinology* 2003; 144:4831–40.

**Pfeiffer, T., Schuster, S. & Bonhoeffer, S.** Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. *Science* 292, 504–507 (2001).

**Pierroz DD, Ziotopoulou M, Ungsuan L, Moschos S, Flier JS, Mantzoros CS.** Effects of acute and chronic administration of the melanocortin agonist MTII in mice with diet-induced obesity. *Diabetes* 2002; 51 :1337–45.

**Pinto S, Roseberry AG, Liu H, Diano S, Shanabrough M, Cai X, Friedman JM, Horvath TL 2004** Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. *Science* 304:110-115

**Qian S, Chen H, Weingarth D, Trumbauer ME, Novi DE, Guan X, et al.** Neither agouti-related protein nor neuropeptide Y is critically required for the regulation of energy homeostasis in mice. *Mol Cell Biol* 2002; 22:5027–35.

**Qu D, Ludwig DS, Gammeltoft S, Piper M, Pelleymounter MA, Cullen MJ, et al.** A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature* 1996; 380:243–7.

**Rankinen T, Bray MS, Hagberg JM, Pérusse L, Roth SM, Wolfarth B, Bouchard C.** The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes: the 2005 update. *Med Sci Sports Exerc.* 2006 Nov;38:1863-88.

**Rubbi CP, Milner J.** Disruption of the nucleolus mediates stabilization of p53 in response to DNA damage and other stresses. *EMBO J.* 2003 Nov 17;22:6068-77.

**Sahu A 1998** Evidence suggesting that galanin (GAL), melanin-concentrating hormone (MCH), neurotensin (NT), proopiomelanocortin (POMC) and neuropeptide Y (NPY) are targets of leptin signaling in the hypothalamus. *Endocrinology* 139:795-798

## BIBLIOGRAFIA

**Saito Y, Nothacker HP, Wang Z, Lin SH, Leslie F, Civelli O.** Molecular characterization of the melanin-concentrating-hormone receptor. *Nature* 1999; 400:265–9.

**Sakata I, J. Yang, C.E. Lee, S. Osborne-Lawrence, S.A. Rovinsky, J.K. Elmquist, J.M. Zigman,** Colocalization of ghrelin O-acyltransferase and ghrelin in gastric mucosal cells, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 297 (2009) E134–E141.

**Schwartzberg-Bar-Yoseph F, Armoni M, Karnieli E (2004)** The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression. *Cancer Res* 64:2627–2633.

**Sergeyev V, Broberger C, Gorbatyuk O, Hokfelt T.** Effect of 2-mercaptoacetate and 2-deoxy-d-glucose administration on the expression of NPY, AGRP, POMC MCH and hypocretin/orexin in the rat hypothalamus. *Neuroreport* 2000; 11:117–21.

**Shintani M, Ogawa Y, Ebihara K, izawa-Abe M, Miyanaga F, Takaya K, Hayashi T, Inoue G, Hosoda K, Kojima M, Kangawa K, Nakao K 2001** Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropéptido Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes* 50:227-232

**Shor-Posner G, Ian C, Brennan G, Cohn T, Moy H, Ning A, et al.** Self-selecting albino rats exhibit differential preferences for pure macronutrient diets: characterization of three subpopulations. *Physiol Behav* 1991; 50 :1187–95.

**Siliciano JD, Canman CE, Taya Y, Sakaguchi K, Appella E, Kastan MB.** DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53. *Genes Dev* 1997; 11: 3471–81.

**Small CJ, Kim MS, Stanley SA, Mitchell JR, Murphy K, Morgan DG, et al.** Effects of chronic central nervous system administration of agouti-related protein in pair-fed animals. *Diabetes* 2001; 50 :248–54.

**Small CJ, Liu YL, Stanley SA, Connoley IP, Kennedy A, Stock MJ, et al.** CNS administration of agouti-related protein (Agrp) reduces energy expenditure. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003; 27 :530–3.

**Solomon JM, Pasupuleti R, Xu L, McDonagh T, Curtis R, DiStefano PS, Huber LJ.** Inhibition of SIRT1 catalytic activity increases p53 acetylation but does not alter cell survival following DNA damage. *Mol Cell Biol.* 2006 Jan;26(1):28-38.

**Suzuki S, Tanaka T, Poyurovsky MV, Nagano H, Mayama T, Ohkubo S, Lokshin M, Hosokawa H, Nakayama T, Suzuki Y et al (2010)** Phosphate-activated glutaminase (GLS2), a p53-inducible regulator of glutamine metabolism and reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:7461–7466.

**Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI 1995** Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83:1263-1271 16. **Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ, Lakey ND, Culpepper J, Moore KJ, Breitbart RE, Duyk GM, Tepper RI, Morgenstern JP 1996** Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell* 84:491-495.

**Tong X, Zhao F, Mancuso A, Gruber JJ, Thompson CB (2009)** The glucose-responsive transcription factor ChREBP contributes to glucose-dependent anabolic synthesis and cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:21660–21665.

**Torri C, Pedrazzi P, Leo G, Muller EE, Cocchi D, Agnati LF, et al.** Diet-induced changes in hypothalamic pro-opio-melanocortin mRNA in the rat hypothalamus. *Peptides* 2002; 23 :1063–8.

**Track NS, McLeod RS, Mee AV.** Human pancreatic polypeptide: studies of fasting and postprandial plasma concentrations. *Can J Physiol Pharmacol* 1980; 58:1484–1489.

**Ueno N, Inui A, Iwamoto M, Kaga T, Asakawa A, Okita M, Fujimiya M, Nakajima Y, Ohmoto Y, Ohnaka M, Nakaya Y, Miyazaki JI, Kasuga M.** Decreased food intake and body weight in pancreatic polypeptide-overexpressing mice. *Gastroenterology* 1999; 117:1427–1432.

## BIBLIOGRAFIA

**Vingtdeux V, Giliberto L, Zhao H, Chandakkar P, Wu Q, Simon JE, Janle EM, Lobo J, Ferruzzi MG, Davies P, Marambaud P.** AMP-activated protein kinase signaling activation by resveratrol modulates amyloid-beta peptide metabolism. *J Biol Chem.* 2010 Mar 19;285:9100-13.

**Warburg, O.** On the origin of cancer cells. *Science* 123, 309–314 (1956).

**Wren AM, Small CJ, Ward HL, Murphy KG, Dakin CL, Taheri S, Kennedy AR, Roberts GH, Morgan DG, Ghatei MA, Bloom SR.** The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology.* 2000.

**Yang J, M.S. Brown, G. Liang, N.V. Grishin, J.L. Goldstein,** Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone, *Cell* 132 (2008) 387–396.

**Yang, Y., Atasoy, D., Su, H. H. & Sternson, S. M.** Hunger states switch a flip-flop memory circuit via a synaptic AMPK-dependent positive feedback loop. *Cell* 146, 992–1003 (2011).

**Yi CO, Jeon BT, Shin HJ, Jeong EA, Chang KC, Lee JE, Lee DH, Kim HJ, Kang SS, Cho GJ, Choi WS, Roh GS.** Resveratrol activates AMPK and suppresses LPS-induced NF- $\kappa$ B-dependent COX-2 activation in RAW 264.7 macrophage cells. *Anat Cell Biol.* 2011 Sep;44:194-203.

**Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M.** Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 1991; 352: 345–47.

**Zhang W, L. Zhao, T.R. Lin, B. Chai, Y. Fan, I. Gantz, M.W. Mulholland,** Inhibition of adipogenesis by ghrelin, *Mol. Biol. Cell* 15 (2004) 2484–2491.

**Zhou Z, Yon Toh S, Chen Z, Guo K, Ng CP, Ponniah S, Lin SC, Hong W, Li P.** Cidea-deficient mice have lean phenotype and are resistant to obesity. *Nat Genet.* 2003 Sep; 35 :49-56.

**Zigman JM, Elmquist JK 2003** Minireview: From anorexia to obesity--the yin and yang of body weight control. *Endocrinology* 144:3749-3756

## BIBLIOGRAFIA

**Zigman JM, Nakano Y, Coppari R, Balthasar N, Marcus JN, Lee CE, Jones JE, Deysher AE, Waxman AR, White RD, Williams TD, Lachey JL, Seeley RJ, Lowell BB, Elmquist JK.** Mice lacking ghrelin receptors resist the development of diet-induced obesity. *J Clin Invest.* 2005 Dec;115:3564-72